

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Reelika Schilf

**Peamiste eukarüootset rakutsüklit reguleerivate tsükliin-CDK komplekside
ekspressioonimine ja puhastamine imetaja rakkudest**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Geenitehnoloogia

Juhendaja: MSc, Ervin Valk

TARTU 2016

Infoleht

Peamiste eukarüootset rakutsükli reguleerivate tsükliin-CDK komplekside ekspresseerimine ja puhastamine imetaja rakkudest

Rakkude kasvamine ja arenemine on kogu elu aluseks. Eukarüootne rakutsükkel jaguneb neljaks faasiks – G1, S, G2 ja M ning seda kontrollib süsteem, mis vastutab iga faasi õigeaegse toimumise eest. Igas rakutsükli etapis on selle olulise rolli kandjaks üks või mitu erinevat tsükliin-CDK kompleksi. Nende ülesandeks on kontrollida DNA replikatsiooni ja muude rakutsükli edukaks kulgemiseks vajalike sündmuste õigeaegset ja tõrgeteta toimumist. Kui üks osa kompleksist või kogu kompleks üleekspresseerub, võib see viia rakkude kontrollimatu jagunemiseni ning lõpuks vähkkasvaja tekkeni. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on anda ülevaade tsükliin-CDK komplekside olulisusest rakutsükli ning töö eksperimentaalses osas oli eesmärgiks kloneerida imetaja ekspressioonivektoritesse rakutsükli seisukohast olulisemad tsükliin-CDK kompleksid ning neid siis ekspresseerida HEK293 rakuliinis ja püüda puhastada aktiivsete kompleksidena.

Märksõnad: tsükliin, CDK, rakutsükkel, CERCS kood :P310 Proteiinid, ensüümid

Expression and purification of the main cell cycle regulative cyclin-CDK complexes

Cell reproduction and growth is necessary for the development of life. The eukaryotic cell cycle is divided into four phases – G1, S, G2 and M and it is controlled by the cell-cycle control system which controls the timing of each phase and makes sure there is enough time between every phase to complete necessary events. Each phase has one or two cyclin-CDK complexes that control DNA replication and other necessary stages in the cell cycle. Cyclin or CDK overexpression leads to uncontrollable cell proliferation which could ultimately lead to cancer. In this thesis the aim was to give an overview of the importance of the cell cycle regulative cyclin-CDK complexes. Also to design mammalian expression vectors for the main cell cycle cyclin-CDK complexes and express them in HEK293 cell line and try to purify them as an active complex.

Keywords: cyclin, CDK, the cell cycle, CERCS code: P310 Proteins, Enzymes

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Eukariootne rakutsüklil	7
1.2 Tsükliinid ja tsükliin-sõltuvad kinaasid kui rakutsükli süda	8
1.2.1. Tsükliin-D1 ja CDK4 kompleks	10
1.2.2 Tsükliin-E ja CDK2 kompleks	10
1.2.3 Tsükliin-A2 ja CDK2 kompleks	11
1.2.4 Tsükliin-B ja CDK1 kompleks	11
1.2.5. Olulisemad CDK-de substraadid rakutsükliis	12
1.3 Valkude puhastamisel kasutatavate süsteemide ja märgiste erinevused	13
2. Eksperimentaalosa	15
2.1 Töö praktilise osa eesmärgid	15
2.2 Materjal ja meetodika	15
2.2.1 Kasutatud vektorid, tüved ja söötmed	15
2.2.2 Tsükliinide ja CDK-de klonimine ekspresseerimiseks	16
2.2.3 Tsükliinide ja CDK-de klonimine ekspresseerimiseks	17
2.2.3.1 Ekspresseerimiseks transformeerimine <i>E. coli</i> tüvesse DH5 α ja plasmiidide eraldamine	18
2.2.4 Tsükliin-CDK komplekside ekspresseerimine HEK293 rakkudes	18
2.2.4.1 Valkude ekspressiooni kontroll western blot analüüsil	19
2.2.4.2 Ekspresseeritud valkude kaheetapiline afiinsuskromatograafia	19
2.2.5 Valke p27 ja pRb kodeerivate järjestuste klonimine	21
2.2.5.1 Valkude p27 ja pRb ekspresseerimine	23
2.2.5.2 Valkude p27 ja pRb puhastamine	23
2.2.5.3 Tsükliin D ja CDK4 eluaatide ning valkude p27 ja pRb signaalide visualiseerimine	24
3. Tulemused ja arutelu	25
3.1 Tsükliin-CDK komplekside ekspresseerimise kontrollimine western blot analüüsil	25
3.2. Tsükliin D-CDK4 kompleksi puhastamine	27
3.3 Tsükliin E-CDK2 kompleksi puhastamine	28
3.4 Tsükliin A-CDK2 kompleksi puhastamine	29

3.5 Tsükliin B-CDK2	30
3.6 Tsükliin D ja CDK4 puhastamine	31
3.7 Valkude p27 ning pRb puhastamine bakterist	33
Kokkuvõte	35
SUMMARY	36
Kasutatud kirjandus	37

Kasutatud lühendid

APC – i.k *Anaphase Promoting Complex* (Anafaasi viiv kompleks)

CDK – i.k *Cyclin – Dependent Kinase* (Tsükliin-sõltuv kinaas)

HEK293 – i.k *Human Embryonic Kidney 293 cells* (Inimese embrüonaalsed neeru 293 rakud)

MPF – i.k *Mitosis-Promoting Factor* (Mitoosi alustav faktor)

SCF – i.k *Skp, Cullin and F-box* (Skp, Cullin ja F-boks)

Sissejuhatus

Elu arengus on tähtsaimal kohal raku jagunemine, mis on jaotunud neljast faasist koosnevaks tsüklikuks – G1, S, G2 ja M. Tänu sellele tsüklikele toimub rakkude kasvamine ja arenemine. Selleks, et rakutsükli faasid õigeaegselt toimuksid, on välja arenenud kontrollsüsteem, mis oma kolme kontrollpunktiga kindlustab faaside õiges järjekorras õigeaegse toimumise.

Igas faasis on oluline roll kindlatel tsükliin-CDK kompleksidel, mille ülesandeks on kontrollida kõikides faasides toimuvate reaktsioonide korrektsust. Kontrollivad, et DNA replikatsioon toimuks õigeaegselt ning vigadeta ja replitseerunud DNA jaotuks võrdselt tütarrakkude vahel. Kui aga üks kompleksis olevast valgust või mõlemad üleekspressseeruvad, siis võib see viia rakkude pidurdamatu jagunemiseni ning lõpuks vähkkasvaja tekkeni.

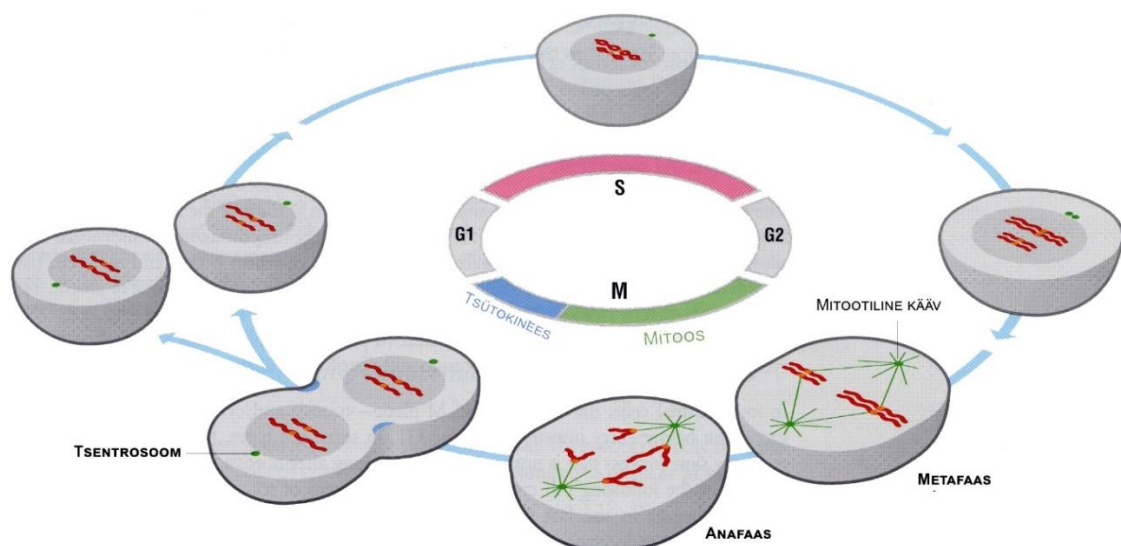
Tsükliinid ja CDK-d on võetud sihtmärgiks vähivastaste ravimite loomisel. Tehes konformatsioonilisi muutusi CDK-de aktiivsajadis, on võimalik disainida väga selektiivseid CDK inhibiitoreid (Choi ja Anders, 2014). Tekitades tsükliinide *knockdown*-e, inhibeeritakse rakkude jagunemist, mis omakorda viib vähkkasvaja rakkude apoptoosini (Androic *et al.*, 2008).

Käesolevas töös on antud ülevaade neljast rakutsükliit reguleerivast tsükliin-CDK kompleksist, nende olulisusest rakutsükliit reguleerimisel ning nende teada olevate substraatide olulisusest. Töö eksperimentaalses osas kloneeriti ekspressioonivektoritesse erinevad rakutsükliit reguleerivad tsükliin-CDK kompleksid ning neid ekspresseeriti imetaja rakkudes eesmärgiga püüda puhastada rakkudest tsükliin-CDK kompleksina.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Eukarüootne rakutsükkel

Evolutsioon oma peaaegu 2 miljardi aasta jooksul on pannud aluse tohutult mitmekesisele eukarüootsele elule. Selle elu arengus on tähtsal kohal rakutsükkel, mis kontrollib rakujagunemist (Satyanarayana ja Kaldis, 2009). Eukarüootne rakutsükkel on konserveerunud fundamentaalne protsess, mis reguleerib rakkude jagunemist üherakulistest organismidest, nagu seda on pärmid, kuni keerukate mitmerakuliste organismideni välja, nagu inimene (Suryadinata *et al.*, 2010). Rakutsükli jooksul peab rakk kahekordistama oma DNA ja peamised rakukomponendid ning jagama need võrdselt kahe identse tütarraaku vahel. Raku jagunemist viivad läbi kindlad valgud ning neid kontrollib rakutsükli kontrollsüsteem, mille ülesandeks on kindlaks teha, et kõik rakutsükli etapid toimuksid õiges järjekorras ning etappide vahel oleks piisavalt aega kõigi ülesannete korrektseks täitmiseks (Morgan, 2007). Eukarüootse raku jagunemine on jaotatud neljaks erinevaks faasiks: G1, S, G2 ja M (Joonis 1).



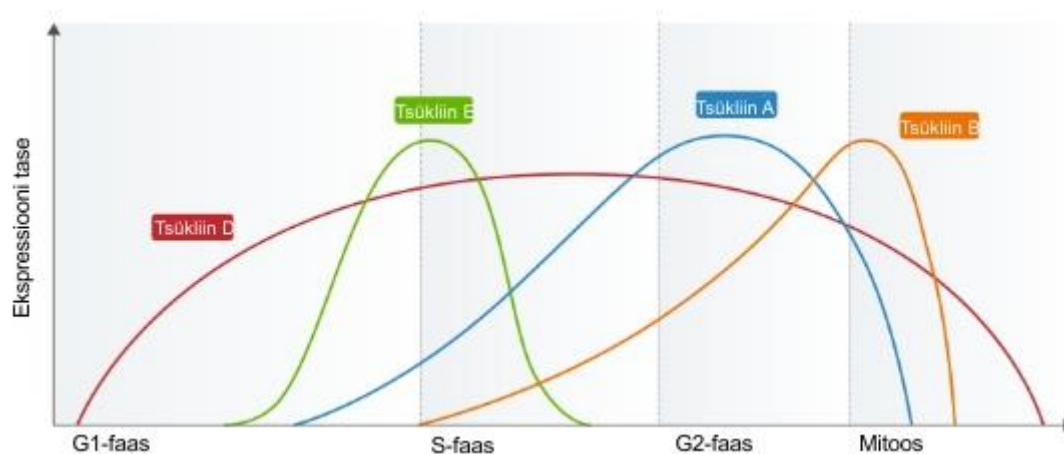
Joonis 1. Eukarüootne rakutsükkel jagatakse tinglikult neljaks faasiks. G1-faasis rakud kasvavad ja valmistuvad uueks tsükliks. S-faasis toimub DNA kahekordistamine – replikatsioon. G2-faasis toimub jagunemiseks vajalike komponentide paljundamine ja kontrollitakse, kas ollakse jagunemiseks valmis. M-faasis tütarchromatiidid joonduvad mitootilisele käävile ning toimub tütarchromatiidide lahknemine. Jagunemine lõpetatakse tsütokineesi ja kahe tütarraaku tekkimisega (Morgan, 2007).

G1 ehk esimese vahefaasi jooksul rakud kasvavad suuremaks. Suureneb ribosoomide, organellide ja valkude arvukus, millega kindlustatakse, et järgnev jagunemine toob kaasa kaks täiesti funktsionaalset tütarrakku (õiges suuruses ja kõigi vajalike komponentidega). Kui ei toimuks rakkude kasvu enne igat jagunemist, jääksid rakud peale igat generatsiooni väiksemaks ning lõpuks ei oleks enam võimelised funktsioneerima. Lisaks kasvamisele peab rakk G1-faasis langetama otsuse, kas alustada uut tsükli või käivitada hoopis diferentseerumise rada. Selleks, et kahekordistada geneetilist materjali, liigub rakk G1-faasist edasi järgmisesse ehk

sünteesifaasi (Alberts, 2015). S-faasi jooksul sünteesitakse täielik DNA koopia, toimub DNA replikatsioon. Duplitseeritakse ka tsentrosoomid, mis mängivad olulist rolli DNA lahknemisel M-faasis. Peale DNA sünteesi liigub rakutsükkel järgmisesse vahefaasi. G2-faasis rakud jätkavad kasvamist (toodetakse valke ja organelle) ning korraldatakse ümber rakkude sisemus. Järgnevas M-faasis rakkude kasvamine lõpeb tütarchromatiidid joonduvad mitootilisele käävile ning kogu tähelepanu on nüüd suunatud jagunemisele. Kromosoomid liiguvad rakus eri poolustele, tekivad uued tuumad ning rakukomponendid jaotuvad võrdselt tütarakkude vahel. Selleks, et iga eelnev etapp lõpeks enne järgneva algust, on välja arenenud rakutsükli kontrollsüsteem, mis vastutab selle eest, et kõik etapid toimuksid õigeaegselt (Morgan, 2007). Rakkude kontrollitud jagunemine toimub tänu kahele molekulide klassile – tsükliinid ja tsükliin-sõltuvad kinaasid (CDK-d) (Morgan, 1997). CDK-d vastutavad selle eest, et rakutsükklis toimuksid kõik faasid õigel ajal. Selleks, et kõike seda läbi viia, on vaja esmalt aktiveerida CDK-d. Aktiveerimine toimub tsükliinide kaasabil – tsükliin ja CDK peab moodustama kompleksi, alles seejärel on CDK-l kinaasne aktiivsus (Gérard ja Goldbeter, 2015). Tsükliin mitte ainult ei aktiveeri oma CDK-d, vaid viib ta spetsiifiliste substraatideni, mida on vaja fosforüleerida (Alberts, 2015).

1.2 Tsükliinid ja tsükliin-sõltuvad kinaasid kui rakutsükli süda

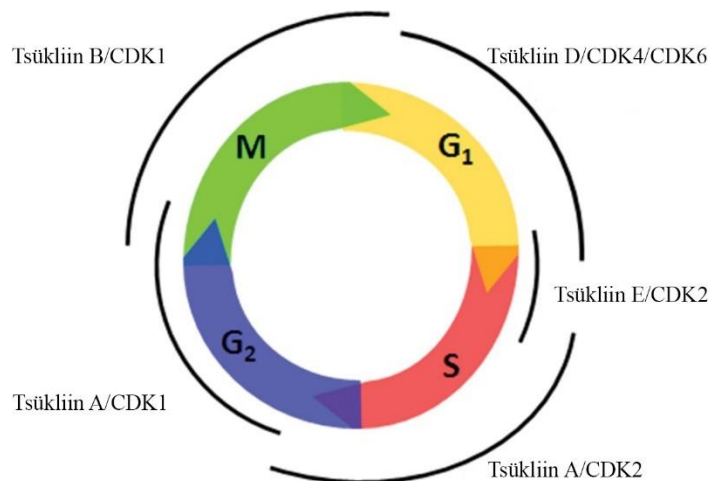
Tsükliinid kuuluvad suurde perekonda, mis koosneb inimorganismis 29st valgust, mille molekulmass jääb 30kDa ja 90kDa vahele (Malumbres, 2014). Tsükliinidel on umbes 100st aminohappesest koosnev struktuur *cyclin box* C-terminaalses otsas, mis on kõikidel tsükliinidel kuni 50% ulatuses sarnane vastavalt klassile, kuhu nad kuuluvad (Lees ja Harlow, 1993). Paljudel tsükliinidel on olemas kaks *cyclin box*-i, üks N-terminaalses otsas CDK sidumiseks ning teine C-terminaalses, mis on vajalik tsükliini korrektseks voltumiseks. Tsükliinid on jaotatud kolme rühma. Rühm I koosneb A, B, D, E, F, G, I, J ja O tsükliinidest, nende hulgas tsükliinid D, E, A ja B on seotud rakutsükliga. II rühma kuulub tsükliin Y ning rühma III kuuluvad tsükliinid H, C, K, L ja T. Kolmanda rühma tsükliinid H ja T moodustavad komplekse transkriptsiooniliste CDK-dega, (Cao *et al.*, 2014) CDK7 ja CDK9-ga (Cai *et al.*, 2006). Rakutsükli regulatsiooniga seotud tsükliinid on reeglina ebastabiilsed valgud, mille süntees ja lagundamine on rakutsüklist sõltuv (Joonis 2).



Joonis 2. Rakutsükli regulatsioonis osalevate tsükliinide ekspressioon erinevates rakutsükli faasides.
<http://www.cureffi.org/2013/04/06/cell-biology-08-cell-cycle-regulation-and-checkpoints/>

Tsükliinidel on olemas *destruction box*, mis asub valgu N-terminaalsest otsast 40-50 aminohappe kaugusel (Klotzbücher *et al.*, 1996) ja on vajalik nende ubiquitineerimiseks (Lees ja Harlow, 1993). Tsükliinide lagundamine käib ubiquitiin sõltuva proteolüüsi kaudu. G1-faasi tsükliinid ubiquitineerib SCF (i.k. *Skp*, *Cullin* ja *F-box*) kompleks, mitoetilised tsükliinid aga APC/C (i.k. *Anaphase Promoting Complex*) (Jackson *et al.*, 2000). See kõik on oluline rakutsükli kontrollis. Mitoosis osalevate tsükliinide A ja B *destruction box*-id on veidi erinevad ning see võibki olla põhjuseks nende erinevatel aegadel lagundamisele (Klotzbücher *et al.*, 1996).

CDK-d on väikesed umbes 300 aminohappest koosnevad ja 35kDa suurused valgud (Malumbres, 2014), mida on inimorganismis 20. CDK-d jagatakse kaheksasse alamsugukonda, neist seitse (CDK1/2/3, CDK5, CDK7, CDK20, CDK18/19, CDK9 ja CDK10/11) on loomades ja seentes konserveerunud ning kaheksandat alamrühma CDK4/6 leidub pärishulkraksetes (Cao *et al.*, 2014). CDK-de tase püsib kogu rakutsükli vältel konstantsena, kuid tsükliinide tase võngub ning olenevalt sellest, millises rakutsükli faasis rakk on, tuleb tsükliinil esile kindel tsükliin (Joonis 3) (Sherr, 1996). Kuna koos tsükliiniga lagundatakse ka temaga kompleksis olev CDK, siis CDK-de regulatsioon toimub tsükliinide sünteesi ja lagundamise kaudu. Tsükliin E ning tsükliin A tase G1- ja G2-faasis on umbes 1/8 nende vastava CDK tasemest., seega CDK-d toodetakse suuremas hulgas ning neid ei kasutata maksimaalselt oma tsükliini poolt (Arooz *et al.*, 2000). Raku regulaatorite ehk tsükliinide üleekspressioon võib viia kontrollimatu rakujagunemiseni ja lõpuks ka vähi tekkeni (Pines ja Hunter, 1992). CDK suurenenud aktiivsus vähkkasvajas pole tingitud mitte CDK ekspressiooni taseme tõusust vaid hoopis tsükliinide suurenenud tasemest rakus (Arooz *et al.*, 2000).



Joonis 3. Imetaja rakkudes kontrollivad erinevates rakutsükli faasides aset leidvaid protsesse kindlad tsükliin ja tsükliin-sõltuva kinaasi (CDK) kompleksid (Suryadinata et al., 2010).

1.2.1. Tsükliin-D1 ja CDK4 kompleks

Tsükliin D1 moodustab kompleksi CDK4-ga ning kontrollib sedasi rakutsükli edasikulgemist G₁-faasist. Tähtsaim substraat moodustunud aktiivsele kompleksile on pRb (i.k. *Retinoblastoma protein*) (Beijersbeigen *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1996; Connell-Crowley *et al.*, 1997; Leng *et al.*, 2002), mida fosforüleeritakse N- ja C-terminaalselt. Fosforüleerimine destabiliseerib seeläbi pRb interaktsiooni E2F transkriptsoonifaktoriga. (Pestell *et al.*, 1999). Vabanenud E2F indutseerib S-faasi sisenemist vahendatave geenide ekspressiooni (Flemington *et al.*, 1993). Tsükliin D1 amplifikatsiooni või üleekspressiooni on täheldatud mitmete pahaloomuliste kasvaja korral, näiteks 50% rinnavähi juhtumitest (Konstantinidis *et al.*, 1998). Leitud on seos tsükliin D1 ning CDK4 liigse avaldumise ning seedeelundkonna vähi tekke vahel (Ito *et al.*, 1999; Al-aynati *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2013). CDK4 hüperaktiivsuse tõttu on vähirakkudel piisavalt jõudu, et aina uuesti ja uuesti rakke jagunema sundida, käivitades G₁-S faasi üleminekut ja lühendades G₁-faasi kestvust (Schmidt *et al.*, 1994; Wölfel *et al.*, 1995; Curtin *et al.*, 2005). Tsükliin D1-CDK4 kompleksi aktiivsust reguleerivad mitmed rakulised inhibiitorid INK4 perekonnast. Nende hulka kuuluvad p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} ja p19^{INK4d}, mis spetsiifiliselt inhibeerivad CDK4 katalüütilisi subühikuid (Sherr, 1994).

1.2.2 Tsükliin-E ja CDK2 kompleks

Normaalsetes rakkudes avaldub tsükliin E hilises G₁-faasis (Sherr ja Roberts, 1999), kus seondub CDK2-ga (Won *et al.*, 1998) S-faasi alguses initsieerib DNA sünteesi ja kontrollib

replikatsiooni edasikulgemist ning tsentrosoomide duplikatsiooni (Strausfeld *et al.*, 1996). Uuringute käigus on leitud tsükliin E üleekspresseerumise ning hepatoomi tekkimise vaheline seos ning ka CDK2 üleekspressiooni on täheldatud 56%-l söögitoru pahaloomulistest kasvajatest (Ito *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 1999).

1.2.3 Tsükliin-A2 ja CDK2 kompleks

Tsükliin A2 ja CDK2 kompleks on olulisel kohal S-faasis ja G2/M -faasi üleminekul (Bendris *et al.*, 2012). S-faasis on tsükliin A kontrolli all DNA replikatsioon ja süntees. Kõige olulisem ülesanne on aga olla päästik tsükliin B1-CDK1 aktiveerumisele G2/M-faasi üleminekul (Yam *et al.*, 2002). Hilises G2 ning varajases M-faasis seondub tsükliin A ka CDK1-ga, et sisenemine mitoosi oleks kindlam (Murray, 2004). Tsükliin A2 seostatakse jagunevate rakkudega ning teda ekspresseeritakse kõrgel tasemel vähkkasvajates (Bendris *et al.*, 2012). Tsükliin A liialt varane ekspressioon tekitab talle vastava kinaasi aktiveerimise, G1-faasi alguses, sellisel tasemel, mis muidu tekiks rakkudes S-faasis. Selle tagajärjel sisenevad rakud liiga vara S-faasi kuna toimub kiirendatud pRb fosforüleerimine (Resnitzky *et al.*, 1995).

1.2.4 Tsükliin-B ja CDK1 kompleks

Tsükliin B, mis paikneb peamiselt imetaja rakkudes tsütoplasmas, jaguneb kolmeks – tsükliin B1 ja B2, mis moodustavad kompleksi CDK1-ga (Brandeis *et al.*, 1998), kuigi mitoosi käigus suundub tsükliin B1 tuuma (Yang *et al.*, 1998) ja tsükliin B3, millel võib olla oluline funktsioon meiotilises rakutsükliis (Nguyen *et al.*, 2002). Mitoosi initsieerimise eest vastutav tsükliin B1-CDK1 kompleks on osa MPF-st (i.k. *M-phase promoting factor*) (Morgan, 1997), ning viib rakud G2-st M-faasi (King *et al.*, 1994), mille jooksul kutsub esile erinevad mitootilised sündumused – tuumamembraani lagunemise ja tsentrosoomide eraldumise (Takizawa ja Morgan, 2000). Tsükliin B-CDK1 kompleksi inaktiveerimine on vajalik mitoosi lõpule viimiseks. Selleks toimub tsükliin B ubikvitiin-seoseline lagundamine APC/C valgu poolt (Pestell *et al.*, 1999; Harper *et al.*, 2002). Kõrget CDK1 taset on kirjeldatud kopsuvähi ja lümfoomi korral (Zhao *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Tsükliin B üleekspressiooni on märgatud mitmete rinna-ja emakakaelavähi juhtumite korral (Zhao *et al.*, 2006). Veelgi enam, tsükliin B1 üleekspressioon on seotud aneuploidsusega ja inimorganismi kartsinoomirakkude kiire jagunemisega (Collecchi *et al.*, 2000). Tõenäoliselt võimaldab tsükliin B1 kõrge ekspressioon rakkudel läbida DNA kahjustuste korral G2 kontrollpunkti (Taylor *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000).

1.2.5. Olulisemad CDK-de substraadid rakutsükliis

CDK-d fosforüleerivad rakutsükli vältel hulganisti valke, mõjutades nii näiteks DNA replikatsiooni, mitoosi ja tsütokineesi. Seega on nende spetsiifiliste substraatide kindlaks tegemine rakutsükli regulatsiooni mõistmise seisukohalt väga oluline. Kirjandusest võib leida küll hulgaliselt erinevaid CDK substraate, kuid vaatamata sellele on arusaamad, kuidas substraate ära tuntakse ja mille alusel valitakse välja just need õiged fosforüleeritavad aminohapped sihtmärkvalkudes, alles lapsekingades. Kasutades valke ja peptiide on leitud, et CDK-d on proliin-suunatud kinaasid ja vajavad seriini või treoniini fosforüleerimiseks kohe nende järel proliini. *In vivo* meetodite vähesuse ja limiteeritud kasutusvõimaluste tõttu on enamus laboreid valinud *in vitro* lähenemise, kus puhastatud tsükliin ja CDK kompleksid segatakse võimalike substraatidega kokku kindlates ja kontrollitud tingimustes (Suryadinata *et al.*, 2010).

Esialgne tsükliin D-CDK4/CDK6 vahendatud pRb fosforüleerimine on vajalik G1/S üleminekuks, mis on seni inhibeeritud pRb poolt (Pestell *et al.*, 1999). pRb inhibeerib transkriptsioonifaktorit E2F (Brehm *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998), mis vabaneb peale pRb fosforüleerimist ja muutub osaliselt aktiivseks ning indutseerib S-faasi edasiminekku vajalikku tsükliin E ekspressiooni (Harbour *et al.*, 1999). E2F täieliku aktiivsuse saavutamiseks on vajalik, et pRb-d fosforüleeriks ka moodustunud tsükliin E-CDK2 kompleks. Tekib positiivne tagasiside tsükkel, kus indutseeritakse veelgi tsükliin E ekspressiooni (Geng *et al.*, 1996; Le Cam *et al.*, 1999).

S-faasis on CDK-de peamine roll DNA replikatsiooni initsieerimine ning kindlustamine, et rakutsükli jooksul toimuks vaid üks replikatsioon (Hamlin *et al.*, 1994). DNA replikatsiooniks on vajalik initsiaator valgu kompleks ORC (i.k. *Origin Replication Complex*). S-faasist kuni M-faasini peab ORC kompleks olema hüperfosforüleeritud (inaktiveeritud), et vältida rereplikatsiooni. Selle eest vastutab tsükliin A-CDK1 kompleks, fosforüleerides valku Orc1 (Li *et al.*, 2004).

Mitoosi juhtimine on tsükliin B-CDK1 kompleksi ülesanne. Tsükliin B-CDK1 ja ubikvitiinligaaskompleksi APC/C vastastikku mõjutamine on vajalik mitoosi edasiminekkuks ja mitoosist väljumiseks (Peters, 2006). APC/C subühikute fosforüleerimine kompleksi poolt aktiveerib APC/C, mis seondub CDC20-le (i.k. *Cell-division cycle protein 20*) (Kraft *et al.*, 2003). Aktiveeritud APC/C^{CDC20} initsieerib tütarchromatiidide lahknemist takistava sekuriini lagundamist (Cohen-Fix *et al.*, 1996; Funabiki *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1999).

1.3 Valkude puhastamisel kasutatavate süsteemide ja märgiste erinevused

Rekombinantsete valgud on leidnud aina enam kasutust ning selle tarvis on välja töötatud erinevad süsteemid valkude ekspressiooniks (Andersen *et al.*, 2002). Igal süsteemil on omad head ja vead ning valkudele pole määratud kindlaid puhastamise tingimusi, vaid need leitakse optimeerimise teel.

Bakteritest on enim kasutust leidnud *Escherichia coli*, mille eeliseks on tema kiire kasv, kõrge produktiivsus ning võrreldes teiste süsteemidega, on ta üks odavamaid (Demain ja Vaishnav, 2009). Miinusteks on inklusioonkehadena toodetud valgud, mis on tihtipeale inaktiivsed ning vajavad ümbervoltumist. Probleeme on selliste valkude tootmisega, mis koosnevad paljudest disulfiidsildadest ning valkudega, mis vajavad sünteesijärgset modifitseerimist (Jenkins ja Curling, 1994).

Pärm on üherakuline eukarüootne organism, mida saab kasutada sünteesijärgset modifitseerimist vajavate valkude ekspressiooniks. Pärm on võimeline mitmesugusteks post-translatsioonilisteks modifikatsioonideks ning on kergem ja odavam kasutada võrreldes imetaja rakkudega. Samuti suudab ekspresseerida valke, mis koosnevad mitmetest disulfiidsildadest. Enim kasutatakse pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae*. Kuigi valkude glükosüülimine ei ole seal mõnel juhul sobiv imetaja valkudele (Demain ja Vaishnav, 2009).

Putukarakud on võimelised keerulisemateks post-translatsioonilisteks modifikatsioonideks kui pärm, neil on ka rohkem väljaarenenud süsteem imetaja valkude pakkimiseks (Agathos, 1991). Enim kasutatud süsteem rekombinantsete valkude ekspressiooniks putukas on bakuloviirus *Autographa californica*, mida saab lihtsalt *in vitro* kasvatada (Knight, 1991). Eelisteks selle süsteemi puhul on eukarüootsele organismile omased post-translatsioonilised modifikatsioonid (Luckow ja Summers, 1988; Miller, 1988). Puudusteks on madal ekspressiooni tase ning hilises infektsioonitsükli moodustuvad rakusisesed agregaadid (Bisbee, 1993).

Imetaja ekspressiooni süsteemi on järjest rohkem hakatud kasutama rekombinantsete valkude produktsioonil, kuna imetaja rakk on võimeline post-translatsioonilisteks modifikatsioonideks ning suudab inimorganismi valkudele sarnaseid struktuure kokku panna (Baldi *et al.*, 2007). Samuti on imetaja rakkudel kõrge produktiivsus (Datar *et al.*, 1993) ja võime ekspresseerida edukalt valke, mis on suuremad kui 50kDa (Rader, 2008). Miinuseks on imetaja rakkude puhul kõrge hind. Rakuline, mida kasutatakse, on erinevaid, näiteks inimese embrüonaalsed neerurakud (HEK) (Langer, 1999) ja Hiina hamstri munasarja rakud (CHO) (Datta *et al.*, 2013).

Selleks, et valitud süsteemis ekspresseeritud valke oleks lihtsam puhastada, on kasutusel mitmed lühikesed peptiidid, millega märgistatakse valgud kas N-või C-terminaalsest otsast. (Tang *et al.*, 1997). Üks enim kasutatav märgistus on FLAG, mis võimaldab antikeha põhists valgu puhastamist (Einhauer ja Jungbauer, 2001; Waugh, 2005). FLAG on hüdrofoobne oktapeptiid (DYKDDDDK) (Knappik ja Plückthun, 1994), mis seondub eelistatult M1 antikehale (Hopp *et al.*, 1996). Seda märgistust on edukalt kasutatud nii pärmi (Einhauer *et al.*, 2002), bakteri (Blonar ja Rutter, 1992) kui ka imetaja rakkude puhul (Kunz, 1992). Sellise märgistuse kasutamine puhastamisel ei ole valku denatureeriv ning saab puhastada aktiivset valku. Puuduseks on see, et puhastamiseks vajalik monoklonaalne antikeha maatriks ei ole väga stabiilne (Schuster *et al.*, 2000).

Teiseks sagedasti kasutatavaks märgiseks on STREP-Tag, mis koosneb strepavidiini äratundvast oktapeptiidist (WSHPQFEK). Valgud, millel on STREP märgis küljes, puhastatakse maatriksil, mis koosneb modifitseeritud strepavidiinist ning elueerimiseks kasutatakse biotiini analoogi (Lichty *et al.*, 2005). Eeliseks STREP-Tag II puhul on tema sõltumatus metalliioonidest (Skerra ja Schmidt, 2000). Sellise märgisega valke on edukalt puhastatud HEK293 rakkudest (Cotten *et al.*, 2003).

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö praktilise osa eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks on:

1. Konstrueerida ekspressiooniplasmiidid, mis sisaldaksid ühte neljast rakutsükliit reguleerivast tsükliin-CDK kompleksist
2. Ekspresseerida tsükliin-CDK komplekse HEK293 rakuliinis ning puhastada valgud aktiivse kompleksina
3. Konstrueerida bakteriaalsed ekspressioonivektorid valkude p27 ja pRb jaoks
4. Ekspresseerida valgud p27 ja pRb ning need bakterist puhastada

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud vektorid, tüved ja söötmed

Tööks vajalik ekspressiooni vektor saadi Icosagen AS-st. Vektorid võimaldasid kloneerida tugevate konstitutiivsete promooterite kontrolli alla ühte ekspressiooni vektorisse nii tsükliini kui CDK.

Tsükliinide D, B ja A cDNA-d telliti ADDgene-st. Tsükliin E telliti sünteetilise DNA-na firmast IDT. CDK2 ja CDK4 cDNA-d telliti firmast ADDgene ning CDK1 kodeeriv järjestus telliti sünteetilise DNA-na firmast IDT.

Valgu p27 kodeeriv järjestus telliti sünteetilise DNA-na firmast IDB. Valgu pRb kodeeriv järjestus amplifitseeriti totaalselt cDNA-lt, mis saadi Dr. Reet Kure grupist.

Valkude p27 ja pRb bakteris ekspresseerimiseks kasutati bakteriaalseid ekspressiooni vektoreid. Vastavalt pET28a (Invitrogen) ja pGEX-4T-1 (GE Healthcare).

Kõikidel kloneerimistel ja plasmiidide paljundamistel kasutati *Escherichia coli* tüve DH5α [supE44, ΔlacU169(ΦlacZΔM15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1] (Invitrogen), mille kompetentsed rakud olid valmistatud laborant Jevgeni Mihhejev'i poolt.

Tsükliin-CDK kompleksid ekspresseeriti HEK293 rakuliinis firmas Icosagen AS.

Valkude p27 ja pRb ekspressiooniks kasutati *E. coli* tüve BL21-CodonPlus(DE3)-RP [*E. coli* B, F⁻, ompT, hsdS(rB⁻,mB⁻), dcm⁺, Tetr, gal, λ(DE3), endA, Hte, (argU proLCamr)] (Stratagene), mille kompetentsed rakud olid valmistatud Jevgeni Mihhejev'i poolt.

Bakterirakke kasvatati LB (Luria Bertani) söötmes [10g/l trüptooni (BD), 5g/l pärmiekstrakti (Formedium), 10g/l NaCl] või 2x YT söötmes [16g/l trüptooni (Formedium), 10g/l pärmiekstrakti (Formedium), 5g/l NaCl].

2.2.2 Tsükliinide ja CDK-de klonerimine ekspressioonivektoritesse

Tsükliinide ja CDK-de kodeerivad järjestused amplifitseeriti polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) (Tabel 1), mille käigus lisati tsükliinide 5' otstesse FLAG märgise järjestus ning CDK-de 3' otstesse STRP märgist kodeeriv järjestus. Sama PCR-i käigus lisati produktide 5' ja 3' otstesse klonerimiseks vajalikud restriksioonisaidid: tsükliinide korral vastavalt BstBI ja PacI ning CDK-de korral vastavalt NotI ja SgsI.

Tabel 1. PCR segud tsükliinide ja CDK-d kodeerivate järjestuste paljundamiseks

Paljundatav järjestus	PCR reaktsioonisegu
CDK1-STRP CDK2-STRP CDK4-STRP	1x Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific), ~40 ng plasmidi, 0,5 µM pärisuunaline praimer, 0,5 µM vastassuunaline praimer
FLAG-tsükliin D FLAG-tsükliin A FLAG-tsükliin B FLAG-tsükliin D	1x HF puhver (Thermo Scientific); ~50 ng plasmidi, 0,5 µM pärisuunaline praimer, 0,5 µM vastassuunaline praimer, 250 µM dNTPde segu, 1 U Phusion DNA polümeraasi (Thermo Scientific)
FLAG-tsükliin E	1x GC puhver (Thermo Scientific), ~50 ng plasmidi, 0,5 µM pärisuunaline praimer, 0,5 µM vastassuunaline praimer, 250 µM dNTP-de segu, 1 U Phusion DNA polümeraasi (Thermo Scientific)

Kõik PCR-id viidi läbi Esco Aeris termotsükleris vastavalt tabelis 2 toodud programmidele.

Tabel 2. Kloneerimisel kasutatud PCR-i reaktsioonid.

Etapp	CDK1, 2, 4	Tsükliin B	Tsükliin E	Tsükliin A, D
1.	98 °C – 10 s	98 °C – 5 min	98 °C – 5 min	98 °C – 5 min
2.	98 °C – 1 s	98 °C – 20 s	98 °C – 20 s	98 °C – 20 s
3.	58 °C – 5 s	52 °C – 20 s	55 °C – 20 s	52 °C – 20 s
4.	72 °C – 14 s	72 °C – 40 s	72 °C – 40 s	72 °C – 30 s
5.	72 °C – 1 min	72 °C – 5 min	72 °C – 5 min	72 °C – 5 min
	Etappe 2-4 tehti 35 kordust	Etappe 2-4 tehti 35 kordust	Etappe 2-4 tehti 35 kordust	Etappe 2-4 tehti 38 kordust

PCR-i produktidele lisati *Orange Loading Dye* (Thermo Scientific) 1x lõppkontsentratsioonini ja produktid lahutati 1% agarosgeelis (0,3 µg/ml etiidiimbromiidi) geelelektroforeesil 1x TAE puhvris (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM äädikhape). Produktid puhastati geelist Favorprep™ *Gel/PCR purification Mini kit* komplekti (Favorgen Biotech Corp.), järgides tootjapoolset protokollit.

2.2.3 Tsükliinide ja CDK-de kloneerimine ekspressioonivektoris

Tsükliinide sisestamiseks ekspressiooni vektorisse, lõigati PCR-i produkti ja vektorit Thermo Scientific *FastDigest* ensüümidega BstBI ja PacI. Restriktsioonisegu PCR-i korral (50 µl): 5 µl 10x *FastDigest* puhvrit, 40 µl geelist puhastatud produkti, 1 µl mõlemat ensüümi, ning 3 µl mQ vett.

Restriktsioonisegu vektori korral (20 µl): 2 µl 10x *FastDigest* puhvrit, 1 µg vektorit, 1 µl kumbagi ensüümi, 1 µl *FastAP Thermosensitive Alkaline* fosfataasi (Thermo Scientific) ja mQ vett 20 µl-ni.

Restriktsiooni reaktsioonid viidi läbi 37 °C juures 60 minuti jooksul, peale mida lisati neile *Orange Loading Dye* 1x lõppkontsentratsioonini. Restriktsiooniproduktid lahutati 1% agarosgeelis (0,3 µg/ml etiidiimbromiidi) geelelektroforeesil 1x TAE puhvris. Õige suurusega produktid puhastati geelist Favorprep™ *Gel/PCR purification Mini kit* ga järgides tootjapoolset protokollit.

Vektori ja tsükliini ligeerimiseks valmistati segu (20 µl): 2 µl eelnevalt lõigatud vektorit ja 5 µl tsükliini, 2 µl 10x T4 ligaasi puhvrit (Thermo Scientific), 1 µl T4 DNA ligaasi (Thermo Scientific) ja 10 µl mQ vett. Reaktsioon toimus üleöö 18 °C juures.

CDK-de klonereimine käis täpselt sama protokollil alusel. Ainult, et tsükliini sisaldavat vektorit ja PCR produkte lõigati nüüd Thermo Scientific *FastDigest* ensüümidega: NotI ja SgsI.

2.2.3.1 Ekspressioonivektorite transformeerimine *E. coli* tüvesse DH5α ja plasmiidide eraldamine

Ligatsiooniproduktid transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5α. 20 µl ligatsioonisegule lisati 20 µl 5x KCM puhvrit (0,5M KCl, 0,15M CaCl₂ ja 0,25M MgCl₂) ning 100 µl-ni mQ vett. Saadud segule lisati 100 µl kompetentseid rakke ja inkubeeriti 20 minutit jääl. Seejärel inkubeeriti segu 42°C juures 90 sekundit ja tõsteti koheselt jääle 2 minutiks. Järgnevalt lisati 500 µl LB söödet ning proove inkubeeriti loksutil 37 °C juures 60 minutit. Järgnevalt tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 2 minutit 6000 p/min ja supernatant eemaldati, jättes tuubi alles 100 µl söödet, milles rakkude sade suspendeeriti ning plaaditi selektiivsetele LB plaatidele, mis sisaldasid kanamütsiini 100 µg/ml. Plaatide hoiti 37 °C juures kolooniate tekkimiseni.

Plasmiidse DNA eraldamiseks pandi plaatidelt koloonia 5 ml LB söötmesse (100 µg/ml kanamütsiini) ja kasvatati loksutil 37 °C juures 12 tundi. Plasmiidne DNA eraldati Favorprep™ *Plasmid DNA extraction Mini kit* ga (Favorgen Biotech Corp.), järgides tootjapoolset juhendit. Tsükliinide ja CDK-de olemasolu plasmiidides kontrolliti sekveneerimisega (EBK DNA sekveneerimise tuumiklaboris).

2.2.4 Tsükliin-CDK komplekside ekspresseerimine HEK293 rakkudes

Sekveneeritud plasmiididest, mis sisaldasid nii tsükliini kui ka CDK-d, tehti midiprep. Selleks kasutati *NucleoBond® Xtra Midi EF* (Macherey-Nagel) komplekti vastavalt tootjapoolsetele juhistele.

Ekspressiooniplasmiidid viidi Icosagen AS-i, kus need transfekkeeriti HEK293 rakuliini. Tsükliin-CDK komplekside ekspresseerimine teostati samuti Icosagen AS-i poolt. Teada on, et valkude tootmine kestis kuus päeva, peale mida rakud koguti tsentrifuugimisel, rakuadeti pesti 1x PBS-iga ja sademed külmutati ning säilitati -80 °C juures. Ekspressiooni kontrolliks koguti proovid tsükliin D-CDK4 kompleksi korral iga kahe päeva tagant ja tsükliin E-CDK2, tsükliin A-CDK2 ning tsükliin B-CDK1 korral ainult viimasel ekspressiooni päeval.

2.2.4.1 Valkude ekspressiooni kontroll western blot analüüsil

Ekspressiooni kontrolliks kogutud proovidest laeti 10 µl 10% SDS–polüakrüülamiid (SDS-PAA) geelile. Valgud lahutati geelelektroforeesil 1x jooksupuhvris (25 mM Tris-i, 192 mM glütsiini ja 0,1% SDS), peale mida inkubeeriti geele 15 minutit ülekandepuhvris *Semi dry* (5,8 g/l Tris, 2,9 g/l glütsiin, 0,37 g/l SDS, 20% metanool).

Valkude ülekanne nitrotselluloosmembraanile (Amersham) toimus Pierce G2 Fast Blotter-iga (Thermo Scientific) kasutades *Standard Semi dry* ülekandeprogrammi. Seejärel membraane inkubeeriti blokeerimislahusega [5% lõss, 1x TBS-T (10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20)] 1 tund toatemperatuuril, millele järgnes tsükliinide korral membraanide inkubeerimine anti-FLAG (1:5000-le lahjendus) antikehaga (Sigma-Aldrich) ning CDK-de puhul anti-Strep-tag II (1:1000-le lahjendus) antikehaga (Abcam). Antikehade lahjendused tehti 1x TBS-T ja 3% lõssi lahusesse. Peale 60 minutilist primaarse antikehaga inkubeerimist pesti membraane 15 minuti ja veel 3 x 5 minutit 1x TBS-T lahusega. Seejärel inkubeeriti kõiki membraane sekundaarse antikeha lahusega [1x TBS-T, 3% lõss ja kitse küüliku IgG vastane antikeha peroksidaasi (HRP) konjugaat (1:10000-le lahjendus) (LabAs)]. Peale 30 minutilist inkubatsiooni pesti membraane täpselt sama moodi kui peale primaarset antikeha. Peale viimast pesu lisati membraanidele Supersignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate reagent (Thermo Scientific) ning signaalide visualiseerimiseks kasutati röntgenfilmi (AGFA). Säriaeg valiti vastavalt signaalide tugevusele.

2.2.4.2 Ekspresseeritud valkude kaheetapiline afiinsuskromatograafia

Valkude puhastamiseks kasutatud puhvrid on toodud tabelis 3. Valgud puhastati enamasti kaheetapiselt kompleksidena. Välja arvatud tsükliin D ja CDK4, mis puhastati kompleksile lisaks ka eraldi valkudena.

Tabel 3. Valkude puhastusel kasutatud puhvrid

Valk	Tsükliin E-CDK2 kompleks	Tsükliin A-CDK2 kompleks	Tsükliin B-CDK1 kompleks
Lüüsi puhver	25 mM Hepes pH 7,5 10 mM KCl, 0,05% Tween 20, 10% glütserool, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 17,3 mg/ml β -glütserofosfaat, 2,1 mg/ml NaF, 180 μ g/ml Na_3VO_4 , 1 μ g/ml aprotiniin, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatiin-A	50 mM Tris pH 7,4 10 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 10% glütserool, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 17,3 mg/ml β -glütserofosfaat, 2,1 mg/ml NaF, 180 μ g/ml Na_3VO_4 , 1 μ g/ml aprotiniin, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatiin-A	25 mM Hepes pH 7,5 10 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 10% glütserool, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 17,3 mg/ml β -glütserofosfaat, 2,1 mg/ml NaF, 180 μ g/ml Na_3VO_4 , 1 μ g/ml aprotiniin, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatiin-A
Rakkudele lisatud sool	150 mM KCl	490 mM NaCl	290 mM NaCl
Pesupuhver	25 mM Hepes pH 7,5, 200 mM KCl, 0,05% Tween 20, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10% glütserool	50 mM Tris pH 7,4, 0,5% Triton X-100, 500 mM NaCl, 10% glütserool, 1 mM DTT	25 mM Hepes pH 7,5, 300 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 10% glütserool, 1 mM DTT
Valk	Tsükliin D-CDK4 kompleks	Tsükliin D ja CDK4 eraldi puhastatuna	
Lüüsi puhver	25 mM Hepes pH 7,6, 10 mM KCl, 0,05% Tween-20, 10% glütserool, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 17,3 mg/ml β -glütserofosfaat, 2,1 mg/ml NaF, 180 μ g/ml Na_3VO_4 , 100 μ l proteaasi inhibiitoreid	25 mM Hepes pH 7,5, 10 mM KCl, 0,1% Tween-20, 10% glütserool, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 17,3 mg/ml β -glütserofosfaat, 2,1 mg/ml NaF, 180 μ g/ml Na_3VO_4 , 1 μ g/ml aprotiniin, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatiin A	
Rakkudele lisatud sool	190 mM KCl	590 mM KCl	
Pesupuhver	25 mM Hepes pH 7,6, 200 mM KCl, 0,05% Tween-20, 10% glütserool, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA	25 mM Hepes pH 7,5, 600 mM KCl, 0,1% Tween-20, 10% glütserool, 1 mM DTT	

Rakusade võeti -80 °C juurest jääle sulama. Sulanud sademele lisati 5 ml lüüsipuhvrit ning rakke töödeldi 20x *Dounce* homogenisaatoriga (Kimble Chase). Seejärel lisati lüsaadile kas KCl või NaCl kontsentratsiooniga, mis on toodud tabelis 3 ning inkubeeriti jääl 15 minutit. Peale inkubeerimist muudeti lüsaat süstla ja nõelaga homogeensemaks ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga 10 minutit 14000 rpm 4 °C juures.

Strep-afiinsuskromatograafia jaoks võeti 200 µl Strep-Tactin XT (IBA) maatriksit Bio-Rad Poly-Prep® kromatograafiakolooni. Maatriksit pesti kahe kolooni ruumala 100 mM Tris lahusega (pH 10,5) ning seejärel kümne kolooni ruumala lüüsipuhvriga. Tsentrifuugitud supernatant lisati pestud kolonnile ning pandi 2 tunniks 4 °C juurde rotaatorile (Rotator-Mixer, Biosan) siduma, peale mida lasti kolonnidel kuivaks joosta. Kolonne pesti kolm korda 10 ml pesupuhvriga, peale mida elueeriti maatriksile seondunud valgud neljas etapis ühe kolooni ruumala Strep-elueerimispuhvriga (25 mM Hepes pH 7,5, 150 mM KCl, 0,1% NP-40, 10% glütserool, 1 mM DTT, 5 mM destiobiotiin). Enne igat elueerimist lasti puhvril seista kolonnis 5 minutit. Kui järgnes FLAG puhastamine, siis eluaadid segati kokku ja mindi edasi FLAG puhastamisega.

FLAG-afiinsuskromatograafia jaoks võeti 200 µl ANTI-FLAG® M2 (Sigma-Aldrich) maatriksit Bio-Rad Bio-Spin® kromatograafiakolooni, mida pesti kahe kolooni ruumala 100 mM glütsiini lahusega (pH 3,5) ning seejärel kahe kolooni ruumala lüüsipuhvriga. Kolonnile lisati strep puhastamise eluaadid ja pandi 2 tunniks 4 °C juurde rotaatorile (Rotator-Mixer, Biosan) seonduma. Kolonnil lasti läbi joosta ning pesti kolm korda 10 ml pesupuhvriga. Maatriksile seondunud valgud elueeriti neljas etapis ühe kolooni ruumala FLAG-elueerimispuhvriga (25 mM Hepes pH 7,5, 150 mM KCl, 10% glütserool, 0,1% NP-40, 1 mM DTT, 150 µg/ml FLAG peptiid). Enne igat elueerimist lasti puhvril seista kolonnis 5 minutit.

Kõikidest puhastamise etappidest võeti proovid, mida analüüsiti western blot analüüsil nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.4.1.

2.2.5 Valke p27 ja pRb kodeerivate järjestuste klonereimine

Valkude p27 ja pRb kodeerivad järjestused amplifitseeriti polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) (Tabel 4 ja 5), mille käigus lisati substraatide 5' ja 3' otstesse klonereimiseks vajalikud restriksioonisaadid: p27 korral vastavalt siis NheI ja BamHI ning pRb korral vastavalt XhoI ja BamHI.

Tabel 4. PCR-i segud p27 ja pRb kodeeriva järjestuse paljundamiseks.

Paljundatav järjestus	PCR reaktsiooni segu (50µ)
p27	1x HF puhver (Thermo Scientific), ~20ng plasmidi, 0,5 µM pärisuunaline praimer, 0,5 µM vastassuunaline praimer, 250 µM dNTP-de segu, 1U Phusion DNA polümeraasi (Thermo Scientific)
pRb	1x Phusion Flash PCR Master Mix (Thermo Scientific), ~40 ng plasmidi, 0,5 µM pärisuunaline praimer, 0,5 µM vastassuunaline praimer

Tabel 5. p27 ja pRb kodeerivate järjestuste paljundamiseks kasutatud PCR programmid

Etap	p27	pRb
1.	98 °C – 5 min	98 °C – 10 s
2.	98 °C – 20 s	98 °C – 1 min
3.	98 °C – 20 s	98 °C – 5 s
4.	98 °C – 18 s	98 °C – 41 s
5.	98 °C – 5 min	98 °C – 1 min
	Etappe 2-4 tehti 35 kordust	Etappe 2-4 tehti 35 kordust

PCR-i produktidele lisati *Orange Loading Dye* (Thermo Scientific) 1x lõppkontsentratsioonini ja produktid lahutati 1% agarosgeelis (0,3 µg/ml etiidumbromiidi) geelelektroforeesil 1x TAE puhvris (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM äädikhape). Produktid puhastati geelist Favorprep™ *Gel/PCR purification kit* ga (Favorgen Biotech Corp), järgides tootjapoolset protokollit.

p27 kloneerimiseks pET28a vektorisse 6xHIS märgise taha lõigati PCR-i produkti ja pET28a vektorit *NheI* ja *BamHI FastDigest* (Thermo Scientific) ensüümidega. Valgu pRb kloneerimiseks pGEX-4T-1 vektorisse GST märgise taha lõigati PCR-i produkti ja vektorit *XhoI* ja *BamHI FastDigest* ensüümidega (Thermo Scientific). Restriktsioonid, ligatsioonid ja transformatsioonid *E. coli* tüvesse DH5α viidi läbi vastavalt nagu punktides 2.2.3 ja 2.2.3.1.

2.2.5.1 Valkude p27 ja pRb ekspresseerimine

Kontrollitud konstruktid transformeeriti *E. coli* tüvesse BL21. Transformatsiooni segusse lisati 1 µl vektorit, 20 µl 5x KCM ja 99 µl mQ vett ning 100 µl kompetentseid rakke. Segu inkubeeriti 20 minutit jääl ja siis 42 °C juures 1 minut ning peale seda pandi 2 minutiks jääle. Järgnevalt lisati segule 500 µl LB söödet ja inkubeeriti 60 minutit 37 °C juures loksutil. Peale seda tsentrifuugiti proove 2 minutit 6000 p/min ning supernatant eemaldati jättes tuubi alles 100 µl söödet. Rakud suspendeeriti ja külvati LB plaatidele, mis sisaldasid kanamütsiini 100 µg/ml (Applichem) ja klooramfenikooli 50 µg/ml (Applichem). Plaatide hoiti 37 °C juures kolooniate tekkimiseni.

Plaatidelt pandi kasvama üks koloonia 5 ml LB söötmesse, kuhu lisati kanamütsiini 100 µg/ml ja klooramfenikooli 50 µg/ml. Üleöö kasvanud kultuure lahjendati (1000x lahjendus) ühte liitrisse 2x YT söötmesse, kuhu lisati kanamütsiini 100 µg/ml. Kultuure kasvatati 37 °C juures kuni tiheduseni OD₆₀₀=0,6, peale mida indutseeriti valkude ekspressioon, lisades 0,5 mM IPTG (isopropüül-β-D-1 tiogalaktopüranosiid) (Thermo Scientific) 6xHis-p27 ekspresseerivatele rakkudele ja 0,3 mM IPTG GST-pRb ekspresseerivatele rakkudele. Valkude ekspressiooni jätkati 16 °C juures 12 tundi. Seejärel tsentrifuugiti rakud RC5 tsentrifugis A6.9 rootoriga 5000 p/min 10 minutit 4 °C juures. Rakud suspendeeriti 50 ml-is 1x PBS-is ning tsentrifuugiti Sigma 4K15 tsentrifugis 12169H rootoriga 5000 p/min 10 minutit 4 °C juures. Saadud sademed külmutati ja hoiustati -80°C peal.

2.2.5.2 Valkude p27 ja pRb puhastamine

pRb ning p27 puhastamine rakkudest toimus samal meetodil, erinesid vaid puhvrid ning kromatograafiakolonnid. Puhastamisel kasutatud puhvrid on toodud tabelis 6.

Tabel 6. Valkude p27 ja pRb puhastamisel kasutatud puhvrid.

Valk	p27	pRB
Lüüsipuhver	50 mM Tris pH 7,4, 300 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5% glütserool, 1 µg/ml aprotiniin, 1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatiin A	50 mM Tris pH 7,4, 300 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 5% glütserool, 1 µg/ml aprotiniin, 1 mM PMSF, 2mM DTT 1 µg/ml pepstatiin A,

Puhver I	50 mM Tris pH 7,4, 600 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5% glütserool	50 mM Tris pH 7,4, 600 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 5% glütserool, 1mM DTT
Puhver II	50 mM Tris pH 7,4, 300 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5% glütserool, 40 mM imidasool	50 mM Tris pH 7,4, 300 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 5% glütserool, 1mM DTT
Puhver III	50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5% glütserool	50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5% glütserool, 1mM DTT
Elueerimispuhver	50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5% glütserool, 300 mM imidasool	50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5% glütserool, 25 mM L-glutatioon

Sulanud sademele lisati 30 ml lüüsipuhvrit ning lüüsi 30 minutit rotaatoril (Rotator-Mixer, Biosan) 4°C juures. Peale seda sonikeeriti lüsaate 60% võimsusel 3 korda 1 minut Bandelin Sonoplus HD 2070 masinaga, sonikeerimiste vahel hoiti lüsaati jääl 1 minut. Lüüsitud rakke tsentrifuugiti RC5 tsentrifuugis Sorvalli SS-34 rootoriga 18000 p/min 40 minutit 4 °C juures.

Bio-Rad Poly-Prep® kromatograafiakolooni kanti 400 µl *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) maatriksit valgu p27 jaoks ja 400 µl *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare) maatriksit valgu pRb tarvis. p27 kolooni pesti viie kolooni ruumala mQ veega ja seejärel kahe kolooni ruumala 200mM NiSO₄. Järgnevalt pesti kolooni viie kolooni ruumala mQ veega ja kümne kolooni ruumala lüüsipuhvriga. pRb kromatograafiakolooni pesti kümne kolooni ruumala lüüsipuhvriga.

Tsentrifuugist saadud lüsaat lisati vastavale kolonnile ning pandi 1 tunniks 4 °C juurde rotaatorile siduma, peale mida lasti kolonnil läbi joosta ning pesti kolooni viis korda kümnekordse kolooni ruumala I pesupuhvriga, viis korda kümne kolooni ruumala II pesupuhvriga ja üks kord kümne kolooni ruumala III pesupuhvriga. Maatriksile seondunud valgud elueeriti toatemperatuuril neljas etapis ühe kolooni ruumala elueerimispuhvriga. Enne igat elueerimist lasti kolonnidel seista elueerimispuhvril 5 minutit.

2.2.5.3 Tsükliin D ja CDK4 eluaatide ning valkude p27 ja pRb signaalide visualiseerimine

Tsükliin D ja CDK4 eluaatidest 15 µl laeti 10% SDS-PAA geelile. Peale geeli jooksmist, hoiti geeli esmalt 30 minutit fikseerimislahuses (10% etanool, 30% äädikhape) ning seejärel värviti 1 tund *Coomassie brilliant blue G-250*-ga ja pesti üleöö vees.

Nii p27 kui ka pRb puhastamise ajal võeti vaheproove, mis kanti 10% SDS-PAA geelile ning värviti valkude visualiseerimiseks *Coomassie Brilliant blue R-250*-ga, seejärel pesti *High Methanol destain* (40% metanool, 7% äädikhape) lahusega ja üleöö veega.

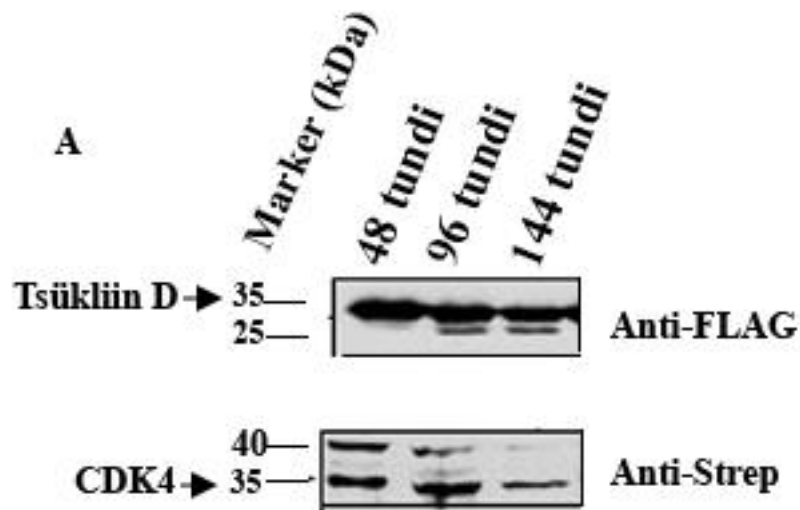
3. Tulemused ja arutelu

Käesoleva töö peamiseks eesmärgiks oli valmistada ekspressioonivektorid, mis sisaldaksid ühte neljast rakutsükliit reguleerivast tsükliin-CDK kompleksist. Selle tarvis valiti ekspressioonivektor, millesse oli võimalik tugevate konstitutiivsete promooterite kontrolli alla viia nii tsükliin kui ka CDK. Tugevatest promooteritest loodeti kiiret ja kestvat ekspressiooni, mis ei oleks sõltuv rakutsüklist. Vektorsüsteemi valimisel mängis olulist rolli võimalus kloneerida tsükliin ja talle vastav CDK samasse vektorisse, mis tagab valkkompleksi komponentide võrdse ekspressiooni taseme rakus ning on rakkudele väiksemaks koormaks kui mitu plasmidi.

Ekspressiooniks vajalikud plasmiidid saadi Icosagen AS-ist. Kuna meil omal laboris puudus võimalus töötada eukarüootsete rakkudega, siis tehti ka HEK293 rakuliini transfektsioonid ja valkude ekspresseerimine Icosagen'is. Tagasi saime sealt tsükliin-CDK kompleksi sisaldavad raku sademed afiinsuspuhastamise jaoks.

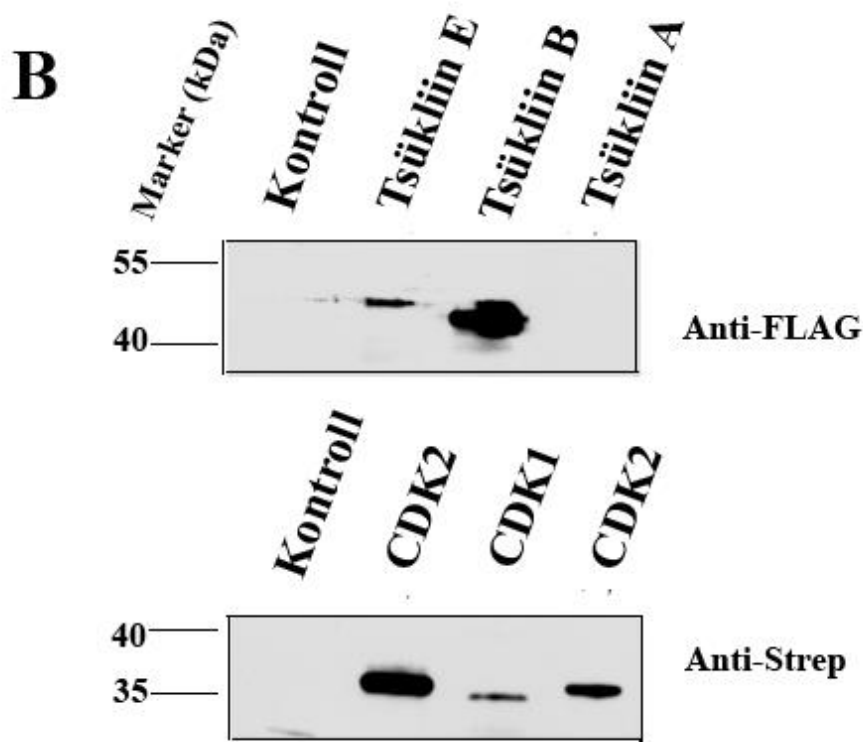
3.1 Tsükliin-CDK komplekside ekspressioonitaseme kontrollimine western blot analüüsil

Esmalt valiti ekspressiooniks tsükliin D-CDK4 kompleks. Hindamaks ekspressiooni tasemeid ja stabiilsust, võeti kuue päevase tootmise vältel välja vaheproovid iga kahe päeva tagant. Western blot analüüs (Joonis 4) näitas nii tsükliin D kui ka CDK4 puhul stabiilset ekspressiooni kuue päeva jooksul.



Joonis 4. Kuue päevase ekspressiooni ajal võetud proovid. CDK4 suurus koos märgisega on 35 kDa ning tsükliin D suurus koos märgisega on samuti 35 kDa. Western blot analüüsiks võeti proovid kuue päevase ekspressiooni ajal iga kahe päeva tagant.

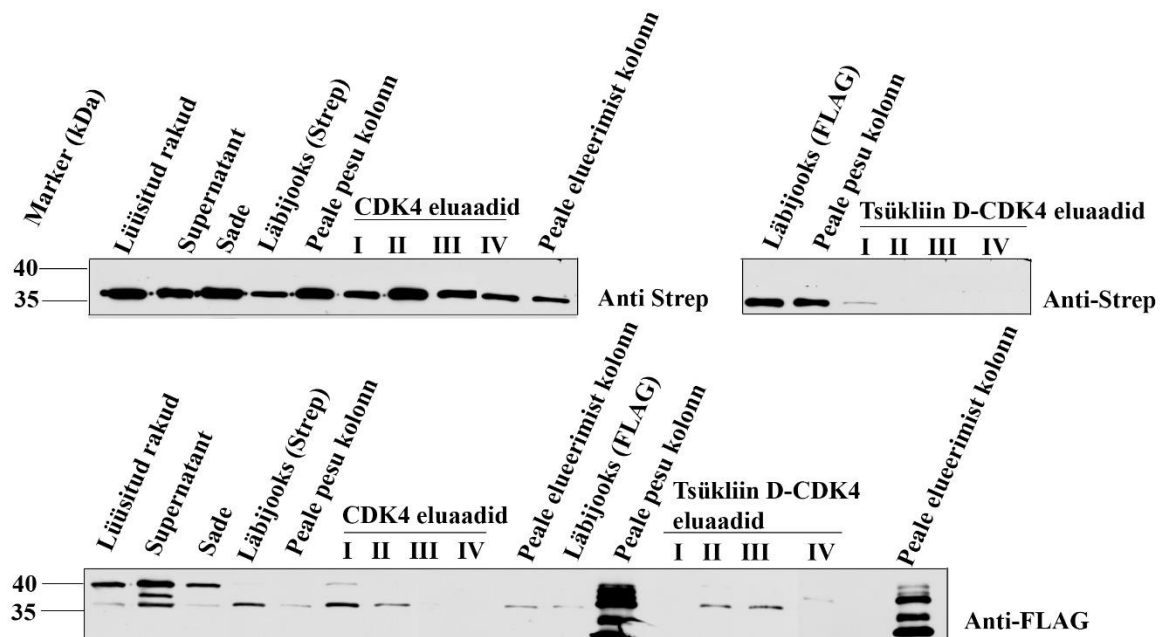
Tsükliin D-CDK4 kompleksiga saadud tulemus julgustas kasutama kuue päevast ekspressiooni ka teiste tsükliin-CDK komplekside puhul, küll aga otsustati võtta western blot analüüsiks ainult üks proov ja see peale kuuendat päeva. Selle eesmärk oli vähendada Icosagen'i töötajate töö hulka. Meie poolt teostatud western blot analüüs (Joonis 5) näitas, et tsükliin E-CDK2 ja tsükliin B-CDK1 komplekside puhul on mõlema komponendi ekspressioon rakkudes olemas. Tsükliin A-CDK2 kompleksi puhul oli western blot'il näha CDK2 ekspressioon, küll aga puudus tsükliin A ekspressioon.



Joonis 5. Tsükliin-CDK komplekside ekspressiooni kontrolli western blot.. Tsükliin E suurus koos märgisega on 48 kDa, tsükliin B suurus koos märgisega 49 kDa ning tsükliin A suurus koos märgisega 40 kDa. CDK2 suurus koos märgisega on 35 kDa ning CDK1 suurus koos märgisega 30 kDa.

3.2. Tsükliin D-CDK4 kompleksi puhastamine

Kompleksi puhastamist alustati Strep-Tag II märgitud CDK4-st. Puhastamisel saadud eluaadid segati kokku ja kanti anti-FLAG aafiinsuskromatograafiakolonnile. Kahe etapilise puhastamise eesmärgiks oli lõpptulemusena saada tsükliin D-CDK4 kompleks, mis sisaldab võrdsel hulgal nii Strep-Tag II märgitud CDK4 kui ka FLAG märgisega tsükliin D. Puhastamise vältel võeti igast etapist ka proov, et hiljem oleks võimalik western blot'il analüüsida puhastamisprotsessi juba iga etapi kaupa. Saadud tulemused on toodud joonisel 6.



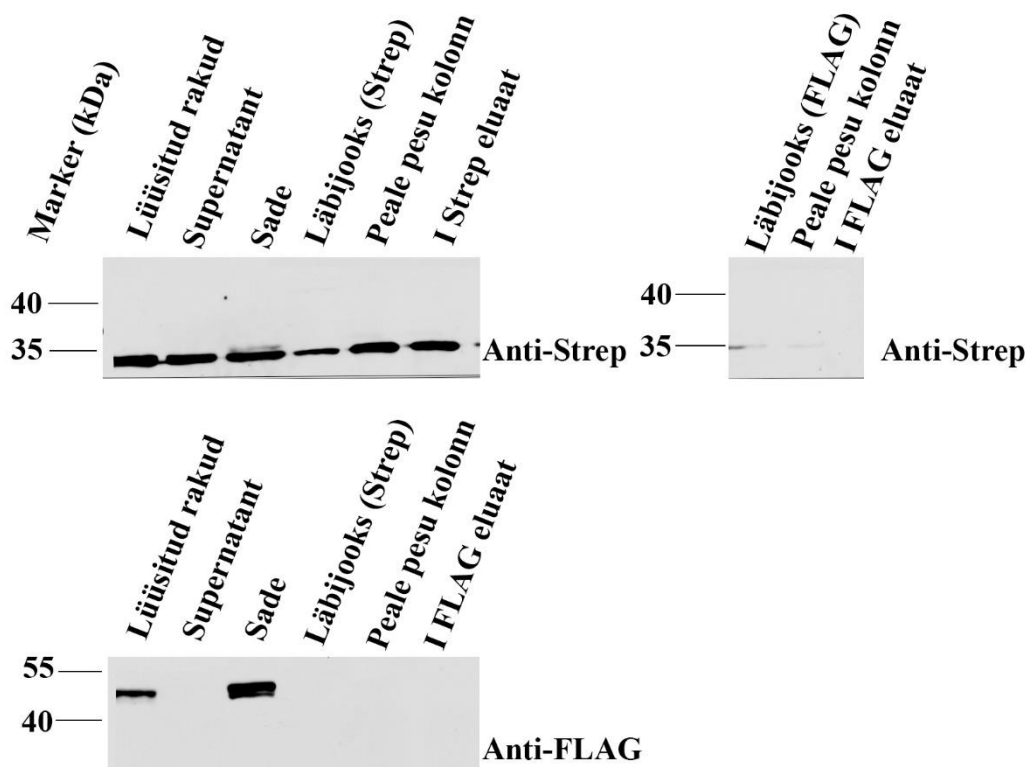
Joonis 6. Tsükliin D-CDK4 kompleksi puhastamise etapid. Tsükliin D ja CDK4 koos märgistega on 35kDa.

Nii tsükliini kui CDK ekspressioon on rakkudes olemas (mõlemad valgud on lüsaadist näha). Samuti on valgud detekteeritavad peale tsentrifuugimist, mis näitab, et valgud on lahustunud faasis. Puhastamine CDK4 korral toimus kenasti. Valk seondus kolonnile, püsis seal pesude käigus ja edukalt oli võimalik see kolonnilt elueerida. Midagi küll jäi ka kolonnile. Võib isegi öelda, et peale esimest etappi on olemas tsükliin D-CDK4 kompleks. Anti-FLAG kolonnile kanti kõik Strep kolonni eluaadid. Näha on, et FLAG märgisega tsükliin D seondub kolonnile ja koos temaga seondub ka CDK4. Probleem tekib aga elueerimisel, kui FLAG kolonnilt elueerub ainult tsükliin D. Mitte aga Strep märgisega CDK4. Tulemustest on näha ka, et suur osa CDK4 ei seonu kompleksis tsükliin D-ga kolonnile, vaid jääb läbijooksu. See oleks selgitatav sellega, et tsükliin D ja CDK4 kompleks on väga nõrk. Kirjandusest on võimalik leida, et kompleksina puhastamiseks tuleks need esmalt linkeriga siduda (Konstantinidis *et al.*, 1998). Selge on see, et kompleksina ei õnnestunud nendel tingimustel tsükliin D-CDK4 kompleksi puhastada

3.3 Tsükliin E-CDK2 kompleksi puhastamine

Kompleksi puhastamist alustati Strep-Tag II märgitud CDK2-st. Puhastamisel saadud eluaadid segati kokku ja kanti anti-FLAG afiinsuskromatograafiakolonnile. Kahe etapilise puhastamise eesmärgiks oli lõpptulemusena saada tsükliin E-CDK2 kompleks, mis sisaldab võrdsel hulgal nii Strep-Tag II märgitud CDK2 kui ka FLAG märgisega tsükliin E. Puhastamise vältel võeti

igast etapist ka proov, et hiljem oleks võimalik western blot'il analüüsida puhastamisprotsessi juba iga etapi kaupa. Saadud tulemused on toodud joonisel 7.



Joonis 7. Tsükliin E-CDK2 kompleksi puhastusel võetud vaheproovid Western Blot analüüsiks. Tsükliin E koos märgisega on 48kDa ning CDK2 koos märgisega 35kDa.

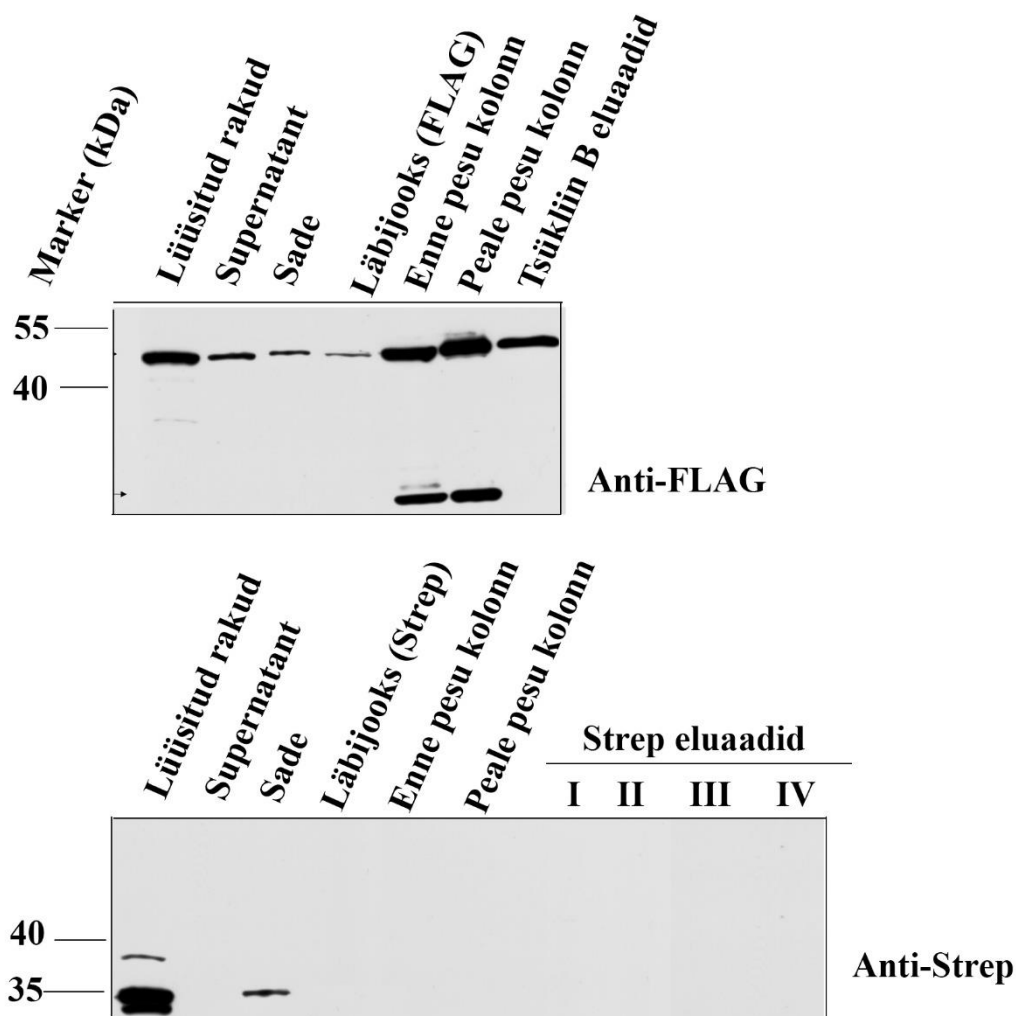
Nii tsükliin E kui ka CDK2 on lüsaadis olemas. CDK2 puhastamine toimus kenasti, töötasid nii sidumine, pesud kui ka elueerimine. Probleemiks kujunes aga tsükliin E. Nagu on western blot'ilt näha ei ole tsükliin sellistel tingimustel lahustuvas fraktsioonis. Ekspressioon on olemas lüsaadis, kuid kaob peale tsentrifuugimist. Järelikult jääb sademesse. Seega ühe komponendi puudumine lahustuvast fraktsioonist muutis võimatuks ka funktsionaalse tsükliin E-CDK2 kompleksi puhastamise.

3.4 Tsükliin A-CDK2 kompleksi puhastamine

Kuna ekspressiooni lõpus kontrolliks välja võetud rakkudes ei õnnestunud tsükliin A ekspressiooni western blot analüüsil tuvastada, siis otsustati tsükliin A-CDK2 kompleksi nendest proovidest mitte puhastada.

3.5 Tsükliin B-CDK2 kompleksi puhastamine

Kompleksi puhastamist alustati FLAG märgitud tsükliin B-ga. Puhastamisel saadud eluaadid segati kokku ja kanti Strep-Tag II affiinsuskromatograafiakolonnile. Kahe etapilise puhastamise eesmärgiks oli lõpptulemusena saada tsükliin B-CDK1 kompleks, mis sisaldab võrdsel hulgal nii Strep-Tag II märgitud CDK1 kui ka FLAG märgisega tsükliin B-d. Puhastamise vältel võeti igast etapist ka proov, et hiljem oleks võimalik western blot'il analüüsida puhastamise protsessi juba iga etapi kaupa. Saadud tulemused on toodud joonisel 8.



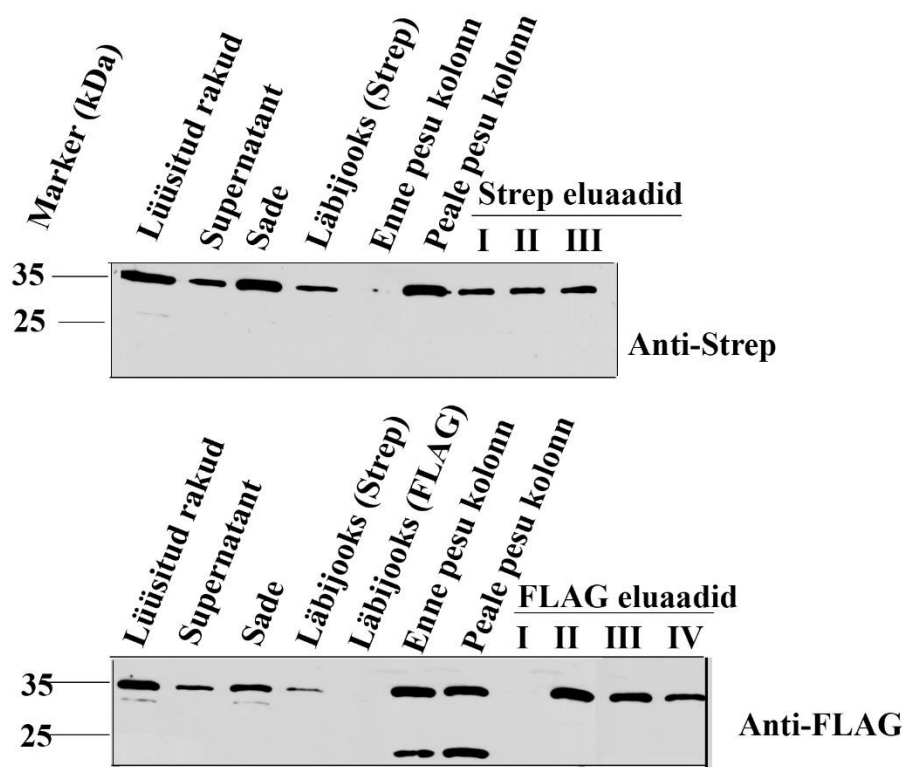
Joonis 8. Tsükliin B-CDK1 puhastamine kompleksina. Tsükliin B koos märgisega on 49kDa ja CDK1 koos märgisega 30kDa.

Nii tsükliini kui CDK ekspressioon on rakkudes olemas (mõlemad valgud on lüsaadis näha). FLAG märgisega tsükliin B puhastamine toimus probleemideta. Valk seondus kolonnile ja püsis seal ka pesude jooksul. Õnnestus ka valgu elueerimine.

Probleemiks kujunes CDK1. Nagu on western blot'ilt näha ei ole CDK1 sellistel tingimustel lahustuvas fraktsioonis. Ekspressioon on olemas lüsaadis, kuid kaob peale tsentrifuugimist. Seega jääb sademesse ning ühe komponendi puudumine lahustuvast fraktsioonist muutis võimatuks ka funktsionaalse tsükliin B-CDK1 kompleksi puhastamise.

3.6 Tsükliin D ja CDK4 puhastamine

Kuna tsükliin D ja CDK4 puhastamine kompleksina ei õnnestunud, siis otsustati proovida puhastamist eraldi valkudena ja kompleks kokku panna peale puhastamist. Tsükliin D ja CDK4 valkude eraldi puhastamist alustati Strep-Tag II kromatograafiakolonnilt, millest pärast sidumist läbijooksud lüsaat kanti edasi anti-FLAG kromatograafiakolonnile. Puhastamise vältel võeti igast etapist ka proov, et hiljem oleks võimalik western blot'il analüüsida puhastamisprotsessi juba iga etapi kaupa. Saadud tulemused on toodud joonisel 9.

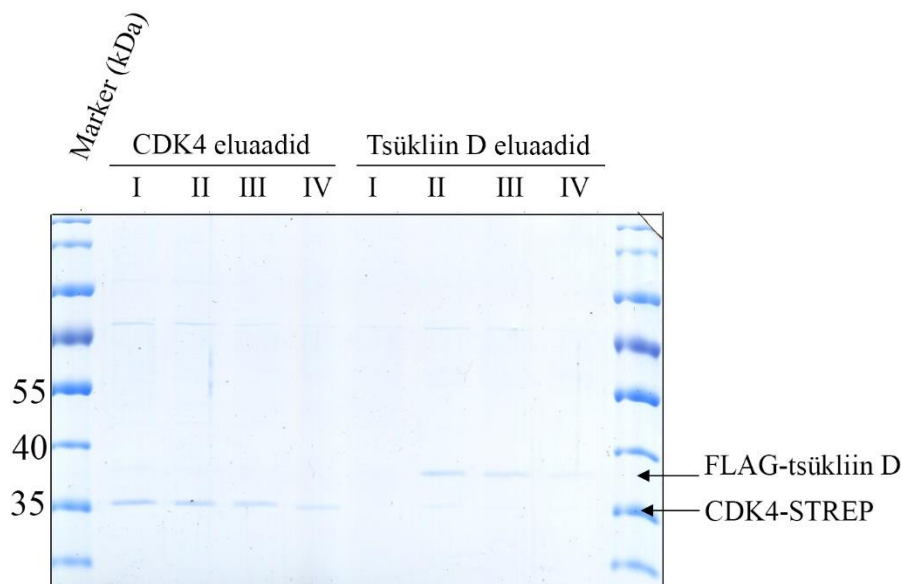


Joonis 9. Metsiktüüpi tsükliin D ja CDK4 puhastamine eraldi. Tsükliin D ja CDK4 on koos märgistega 35kDa.

CDK4 ekspressioon oli lüsaadis olemas ning valk püsis lahustuvana ekspressiooni lõpuni ning puhastamine Strep-Tag II kolonniga õnnestus kenasti. Valk seondus kolonnile, püsis seal pesude vältel. Õnnestus ka kolonnilt elueerimine. Western blot'is on korralds küll CDK4 otsekui kadunud kolonnilt vahetult peale sidumist ja enne pesusid. Kuid selle võib lugeda katseveaks, sest järgmisel rajal on signaal jälle olemas. Samuti on signaalid olemas eluaatides.

Tsükliin D ekspressioon oli lüsaadis ja lahustuvas faasis olemas. Samuti oli valk olemas lüsaadis peale CDK4 Strep-Tag II kolonnile sidumist. Tsükliin seondus FLAG kolonniga ja püsis seal kõigi pesude jooksul. Samuti õnnestus tsükliin D kolonnilt elueerimine.

Et hinnata puhastatud valkude puhtust ja koguseid, otsustati lisaks western blot'ile analüüsida valkude eluaate ka 10% SDS-PAA geelil värvides valke *Coomassie brilliant blue G-250*-ga (Joonis 10). Valkude koguseid on vaja hiljem tsükliin-CDK kompleksi kokku segamisel. Tsükliin D ja CDK4 eluaatidest 15 µl laeti 10% SDS-PAA geelile. Kõigis CDK4 eluaatidel oli näha geelil õige suurusega valku.. Samamoodi oli ka western blot analüüsil. Tsükliin D eluaatidest oli valku näha II ja III eluaadis, vähesel määral ka IV eluaadis. Sarnane oli ka western blot analüüsi tulemus.



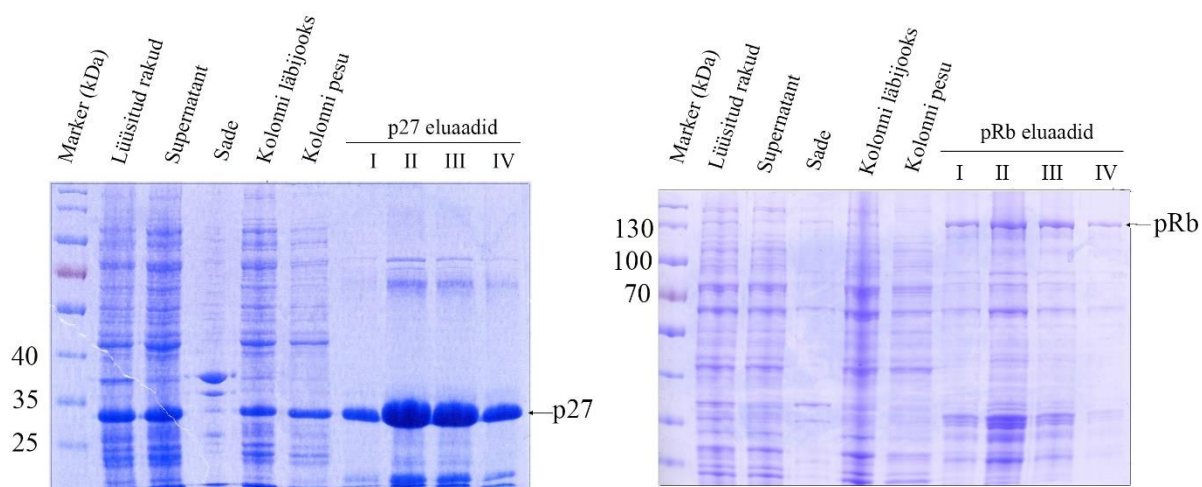
Joonis 10. Eraldi puhastatud tsükliin D ja CDK4 eluaadid. Tsükliin D ja CDK4 on koos märgistega 35kDa.

Kokkuvõtteks võib öelda, et erinevalt kompleksina puhastamisest õnnestus tsükliin D ja CDK4 puhastamine eraldi valkudena paremini. Järgmisena oleks tarvis testida, kas kompleks omab ka aktiivsust, kui see panna kokku *in vitro* eraldi puhastatud komponentidest.

3.7 Valkude p27 ning pRb puhastamine bakterist

Et testida eelmises etapis kirjeldatud tsükliin D ja CDK4 kompleksi aktiivsust otsustati puhastada antud kompleksile spetsiifilised substraadid bakterist. Bakterist puhastamine on suhteliselt lihtne ja kiire. Samuti tagab see, et puhastatud valgud ei ole eelnevalt fosforüleeritud. Eriti oluline on see kinaasikatsetes, kui soovitakse analüüsida substraadi fosforüleermist kinaasi poolt. Siis on tähtis, et kinaasi poolt fosforüleeritavad positsioonid oleksid eelnevatest fosfaatidest vabad. p27 sai puhastatud ka põhjusel, et kirjeldatud on tema rolli ka tsükliin D ja CDK4 kompleksi aktiveerimisel.

Valgu p27 puhastamiseks kasutati N-terminaalset 6xHIS märgist ja valgu pRb korral N-terminaalset GST märgist. GST märgise kasuks otsustati, sest pRb puhul on tegemist suure valguga ja on oht, et bakteris ekspresseerides ei jää see lahustuvaks (läheb inkluusioonkehadesse). Teada on, et GST märgis aitab suuremaid valke bakteris ekspresseerides lahuses hoida. Mõlema valgu puhastamise ajal võeti vaheproove, mis kanti 10% SDS-PAA geelile (joonis 11), et hinnata iga puhastuse etappi eraldi.



Joonis 11. Substraatide p27 ja pRb puhastamise vaheproovidest laetud geelid. p27 suurus koos 6xHIS märgisega on 23kDa ning pRb suurus koos GST märgisega on 132kDa.

p27 geelil on näha tugevat p27 signaali läbi kogu puhastuse. Sademest laetud proovil on näha väga nõrka p27 signaali, seega enamus valgust jäi supernatanti ning sademesse jäi väga väike hulk. Ka p27 eluaatidel on tugev signaal ning valk elueerus kolonnilt kenasti.

pRb geelilt on näha, et ekspresioonitase võrreldes p27 valguga on tunduvalt madalam. Aga samas on see normaalne suurte valkude puhul. Bakteris jäävadki nende ekspresioonitasemed madalamaks. Samas on valk olemas eluaatides. See ei ole küll nii puhas kui p27 korral. Ka see

on seletatav madalama ekspressiooniga, mis jätab suurema võimaluse kontaminantidel ebaspetsiifiliselt kolonnile seonduda.

Käesoleva töö raames õnnestus puhastada valgud tsükliin D ja CDK4 imetaja rakkudest ning vastavale tsükliin-CDK kompleksile spetsiifilised substraadid bakterist. Järgmise sammuna tuleks testida tsükliin-CDK kompleksi aktiivsust, kasutades substraatidena bakterist puhastatud valke p27 ja pRb. Kuna imetaja rakkudega töötamine on suhteliselt kallis ja aeganõudev, siis tuleks mõelda ka alternatiivsetele meetoditele, nagu näiteks eukarüootsete tsükliin-CDK komplekside ekspresseerimisele pagaripärmist, kuna see on märksa odavam ja kiirem. Kasutades pärmi, oleks võimalik lihtsamalt optimeerida tsükliin-CDK puhastamiseks vajalikke tingimusi.

Kokkuvõte

Eukarüootset rakutsükli kontrollivad neli erinevat tsükliin-CDK kompleksi. Igal kompleksil on oma kindel roll rakutsükli reguleerimisel. Kompleks peab vastutama selle eest, et rakutsükli DNA replikatsioon toimuks korrektselt ja õigeaegselt ning rakk ei läheks liiga vara mitoosi. Rakutsükli reguleerimisele aitavad kaasa ka mitmed tsükliin-CDK substraadid, nagu näiteks pRb valk. Tsükliin-CDK komplekse on uuritud pikemaajaliselt ning leitud on seos komplekside üleekspressiooniga ja vähkkasvaja tekke vahel. Seetõttu on tsükliinid ja CDK-d sihtmärgiks vähivastases teraapias.

Töö teoreetilises osas anti ülevaade rakutsükli reguleerivatest tsükliin-CDK kompleksidest ning nende olulisusest rakutsükli eri faasides. Töö eksperimentaalses osas konstrueeriti ekspresioonivektorid erinevate tsükliin-CDK kompleksidega. Neid vektoreid imetaja rakkudes ekspresseerides oli käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks puhastada tsükliin-CDK rakkudest kompleksina.

Komplekside puhastamiseks kasutati nii anti-Strep kui ka anti-FLAG afiinsuskromatograafiat. Ekspresiooniks kasutati HEK293 rakuliini, kuna imetaja rakk on võimeline vajalikeks post-translatsioonilisteks modifikatsioonideks ning esineb kõrge produktiivsus. Töö tulemuste all oli näha, et kompleksina tsükliin-CDK puhastamine ei õnnestunud ning seetõttu kahte ekspresseeritud tsükliin-CDK kompleksi (mutant tsükliin D-CDK4 ning metsiktüüpi tsükliin D-CDK4) puhastati rakkudest eraldi. Ebaõnnestunud komplekside puhastamine võis olla tingitud mitmest asjaolust. Kuna tsükliin A puudus täielikult juba lüüsitud rakkudes, siis tuleb tsükliin A ekspressiooni aega optimeerida, sest kuuepäevase tootmise järel oli valk juba lagundatud. Samuti ka nende tsükliinide ja CDK-de puhastusel, mis jäid sademesse, tuleks optimeerida lüüsipuhvrit.

SUMMARY

Expression and purification of the main cell cycle regulative cyclin-CDK complexes

Reelika Schilf

The cell cycle is divided into four phases – G1, S, G2 and M. Successful cell growth and proliferation of cells depends on the correct order and timing of these phases, which is regulated by the cell-cycle control system. Cell cycle control system involves CDK activity. CDKs are activated by forming a complex with cyclins. Then they have the ability to phosphorylate different protein substrates as a result making changes in the substrate activity or interactions with other proteins. Each phase is regulated by a different cyclin-CDK complex that ensures the cell proceeds to another phase at the right time. Overexpression of cyclins and/or CDKs leads to uncontrollable cell proliferation and ultimately cancer.

In this thesis expression vectors were designed for four different cyclin-CDK complexes that regulate the cell cycle. The purpose was to express these complexes in HEK293 cell line and purify them as a complex. Anti-Strep and anti-FLAG affinity columns were used for purification. Expression vectors were designed for two cell cycle substrates – pRb and p27 and were purified from BL21 cell line.

The results showed that purifying the cyclin-CDK as a complex was unsuccessful. so purifying the wild-type cyclin D-CDK4 and mutant cyclin D-CDK4 separately was tried. Purifying each protein separately worked in both cases. The substrate purification was also a success.

To purify the proteins again as a complex, the expression and purification conditions for each cyclin-CDK complex would have to be optimized. For example, since the expression last for six days, cyclin A could not be seen even in lysed cells, therefore cyclin A was already degraded. In order to have expressed cyclin A in cells the expression time of the cells has to be optimized.

Kasutatud kirjandus

Agathos, S.N. (1991). Production scale insect cell culture. *Biotechnol. Adv.* 9: 51–68.

Al-aynati, M.M., Radulovich, N., Ho, J., ja Tsao, M. (2004). Overexpression of G1-S Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases during Multistage Human Pancreatic Duct Cell Carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 10: 6598–6605.

Alberts, B. (2015). *Molecular biology of the cell*, 6th edition.

Andersen, D.C., Krummen, L., Andersen, K., Anderson, D., ja Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 117–123.

Androic, I., Krämer, A., Yan, R., Rödel, F., Gätje, R., Kaufmann, M., Strebhardt, K., Yuan, J., Weigelt, B., Peterse, J., *et al.* (2008). Targeting cyclin B1 inhibits proliferation and sensitizes breast cancer cells to taxol. *BMC Cancer* 8: 391.

Arooz, T., Yam, C.H., Siu, W.Y., Lau, A., Li, K.K.W., ja Poon, R.Y.C. (2000). On the concentrations of cyclins and cyclin-dependent kinases in extracts of cultured human cells. *Biochemistry* 39: 9494–9501.

Baldi, L., Hacker, D.L., Adam, M., ja Wurm, F.M. (2007). Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: State of the art and future perspectives. *Biotechnol. Lett.* 29: 677–684.

Beijersbeigen, R.L., Carlee, L., Kerkhoven, R.M., ja Bernards, R. (1995). Regulation of the retinoblastoma protein-related p107 by G1 cyclin complexes. *Genes Dev.* 9: 1340–1353.

Bendris, N., Loukil, A., Cheung, C., Arsic, N., Rebouissou, C., Hipskind, R., Peter, M., Lemmers, B., ja Blanchard, J.M. (2012). Cyclin A2: a genuine cell cycle regulator? *Biomol. Concepts* 3: 535–543.

Bisbee, C.A. (1993). Current perspectives on manufacturing and scaleup of biopharmaceuticals. *Gen Eng News* 13:8-10

Blanar, M.A., ja Rutter, W.J. (1992). Interaction cloning: identification of a helix-loop-helix zipper protein that interacts with c-Fos. *Science* 256: 1014–1018.

- Brandeis, M., Rosewell, I., Carrington, M., Crompton, T., Jacobs, M.A., Kirk, J., Gannon, J., ja Hunt, T. (1998). Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 4344–4349.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., ja Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391: 597–601.
- Cai, D., Latham, V.M., Zhang, X., ja Shapiro, G.I. (2006). Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res.* 66: 9270–9280.
- Le Cam, L., Polanowska, J., Fabbrizio, E., Olivier, M., Philips, A., Ng Eaton, E., Classon, M., Geng, Y., ja Sardet, C. (1999). Timing of cyclin E gene expression depends on the regulated association of a bipartite repressor element with a novel E2F complex. *EMBO J.* 18: 1878–1890.
- Cao, L., Chen, F., Yang, X., Xu, W., Xie, J., ja Yu, L. (2014). Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evol. Biol.* 14: 10.
- Choi, Y.J., ja Anders, L. (2014). Signaling through cyclin D-dependent kinases. *Oncogene* 33: 1890–1903.
- Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W., ja Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* 10: 3081–3093.
- Collecchi, P., Santoni, T., Gnesi, E., Giuseppe Naccarato, A., Passoni, A., Rocchetta, M., Danesi, R., ja Bevilacqua, G. (2000). Cyclins of phases G1, S and G2/M are overexpressed in aneuploid mammary carcinomas. *Cytometry* 42: 254–260.
- Connell-Crowley, L., Harper, J.W., ja Goodrich, D.W. (1997). Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 8: 287–301.
- Cotten, M., Stegmueller, K., Eickhoff, J., Hanke, M., Herzberger, K., Herget, T., Choidas, A., Daub, H., ja Godl, K. (2003). Exploiting features of adenovirus replication to support mammalian kinase production. *Nucleic Acids Res.* 31: e128
- Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.-H., Aiba, S., Bröcker, E.B., LeBoit, P.E., *et al.* (2005). Distinct sets of genetic alterations in

melanoma. *N. Engl. J. Med.* 353: 2135–2147.

Datar, R. V, Cartwright, T., ja Rosen, C.G. (1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology. (N. Y).* 11: 349–357.

Datta, P., Linhardt, R.J., Sharfstein, S.T. (2013). An 'omics approach towards CHO cell engineering. *Biotechnol Bioeng.* 110: 1255-1271

Demain, A.L., ja Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 27: 297–306.

Dyson, M.R., Shadbolt, S.P., Vincent, K.J., Perera, R.L., ja McCafferty, J. (2004). Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol.* 4: 32.

Einhauer, A., ja Jungbauer, A. (2001). The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* 49: 455–465.

Einhauer, A., Schuster, M., Wasserbauer, E., ja Jungbauer, A. (2002). Expression and purification of homogenous proteins in *Saccharomyces cerevisiae* based on ubiquitin-FLAG fusion. *Protein Expr. Purif.* 24: 497–504.

Flemington, E.K., Speck, S.H., ja Kaelin, W.G. (1993). E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 6914–6918.

Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., ja Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* 381: 438–441.

Geng, Y., Eaton, E.N., Picón, M., Roberts, J.M., Lundberg, A.S., Gifford, A., Sardet, C., ja Weinberg, R.A. (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 12: 1173–1180.

Gérard, C., ja Goldbeter, A. (2015). Dynamics of the mammalian cell cycle in physiological and pathological conditions. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 8: 140-156.

Hamlin, J.L., Mosca, P.J., ja Levenson, V. V (1994). Defining origins of replication in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1198: 85–111.

Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A., ja Dean, D.C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb

functions as cells move through G1. *Cell* 98: 859–869.

Harper, J.W., Burton, J.L., ja Solomon, M.J. (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev.* 16: 2179–2206.

Hopp, T.P., Gallis, B., ja Prickett, K.S. (1996). Metal-binding properties of a calcium-dependent monoclonal antibody. *Mol. Immunol.* 33: 601–608.

Ito, Y., Matsuura, N., Sakon, M., Miyoshi, E., Noda, K., Takeoa, T., Umeshita, K., Nagano, H., Nakamori, S., Dono, K., *et al.* (1999). Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 Independently predicts the recurrence. *Hepatology* 30: 90–99.

Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., ja Reimann, J.D.R. (2000). The lore of the RINGs: Substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10: 429–439.

Jenkins, N., ja Curling, E.M. (1994). Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 354–364.

King, R.W., Jackson, P.K., ja Kirschner, M.W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* 79: 563–571.

Klotzbücher, a, Stewart, E., Harrison, D., ja Hunt, T. (1996). The „destruction box“ of cyclin A allows B-type cyclins to be ubiquitinated, but not efficiently destroyed. *EMBO J.* 15: 3053–3064.

Knappik, A., ja Plückthun, A. (1994). An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments. *Biotechniques* 17: 754–761.

Knight, P. (1991). Baculovirus Vectors for Making Proteins in Insect cells. *Features* 57: 567–570.

Konstantinidis, a K., Radhakrishnan, R., Gu, F., Rao, R.N., ja Yeh, W.K. (1998). Purification, characterization, and kinetic mechanism of cyclin D1. CDK4, a major target for cell cycle regulation. *J. Biol. Chem.* 273: 26506–26515.

Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J., ja Peters, J.-M. (2003). Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J.* 22: 6598–6609.

Kunz, D., Gerard, N.P., Gerard, C. (1992). The human leukocyte platelet-activating factor receptor. cDNA cloning, cell surface expression and construction of a novel epitope-bearing analog. *J. Biol. Chem.* 267, 9101–9106.

- Langer, L.J. (1999). U.S Biotech symposium focuses on bioprocessing: economic strategies to increase production yields. *Gen Eng News*. 19: 1-14
- Lees, E.M., ja Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1194–1201.
- Leng, X., Noble, M., Adams, P.D., Qin, J., ja Harper, J.W. (2002). Reversal of growth suppression by p107 via direct phosphorylation by cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4. *Mol. Cell. Biol.* 22: 2242–2254.
- Li, C., Vassilev, A., ja DePamphilis, M.L. (2004). Role for Cdk1 (Cdc2)/cyclin A in preventing the mammalian origin recognition complex's largest subunit (Orc1) from binding to chromatin during mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 24: 5875–5886.
- Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J., ja Tan, S. (2005). Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr. Purif.* 41: 98–105.
- Lu, J.W., Lin, Y.M., Chang, J.G., Yeh, K.T., Chen, R.M., Tsai, J.J.P., Su, W.W., ja Hu, R.M. (2013). Clinical implications of deregulated CDK4 and Cyclin D1 expression in patients with human hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol.* 30: 379.
- Luckow, V.A., ja Summers, M.D. (1988). Trends in the Development of Baculovirus Expression Vectors. *Bio/Technology* 6: 47–55.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J.P., Troalen, F., Trouche, D., ja Harel-Bellan, A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* 391: 601–605.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 15: 122.
- Matsumoto, M., Furihata, M., Ishikawa, T., Ohtsuki, Y., ja Ogoshi, S. (1999). Comparison of deregulated expression of cyclin D1 and cyclin E with that of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK2 in human oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 80: 256–261.
- Miller, L.K. (1988). Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.* 42: 177–199.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 261–291.
- Morgan, D.O. (2007). *The Cell Cycle - Principles of Control*.

- Murray, A.W. (2004). Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell* 116: 221–234.
- Nguyen, T.B., Manova, K., Capodiceci, P., Lindon, C., Bottega, S., Wang, X.-Y., Refik-Rogers, J., Pines, J., Wolgemuth, D.J., ja Koff, A. (2002). Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin. *J. Biol. Chem.* 277: 41960–41969.
- Park, M., Chae, H.D., Yun, J., Jung, M., Kim, Y.-S., Kim, S.-H., Han, M.H., ja Shin, D.Y. (2000). Constitutive Activation of Cyclin B1-associated cdc2 Kinase Overrides p53-mediated G2-M Arrest. *Cancer Res.* 60: 542–545.
- Pestell, R.G., Albanese, C., Reutens, a T., Segall, J.E., Lee, R.J., ja Arnold, A. (1999). The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr. Rev.* 20: 501–534.
- Peters, J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 644–656.
- Pines, J., ja Hunter, T. (1992). Cyclins A and B1 in the human cell cycle. *Ciba Found Symp* 170: 187–196.
- Rader, R. (2008). Expression systems for process and product improvement. *BioProc Intern.* June: 4–9.
- Resnitzky, D., Hengst, L., ja Reed, S.I. (1995). Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4347–4352.
- Satyanarayana, A., ja Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28: 2925–2939.
- Schmidt, E.E., Ichimura, K., Reifengerger, G., ja Collins, V.P. (1994). CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res.* 54: 6321–6324.
- Schuster, M., Wasserbauer, E., Einhauer, A., Ortner, C., Jungbauer, A., Hammerschmid, F., ja Werner, G. (2000). Protein expression strategies for identification of novel target proteins. *J. Biomol. Screen.* 5: 89–97.
- Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Sci.* 274: 1672-1677
- Sherr, C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79: 551–555.
- Sherr, C.J., ja Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-

phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501–1512.

Skerra, A., ja Schmidt, T.G. (2000). Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 326: 271–304.

Strausfeld, U.P., Howell, M., Descombes, P., Chevalier, S., Rempel, R.E., Adamczewski, J., Maller, J.L., Hunt, T., ja Blow, J.J. (1996). Both cyclin A and cyclin E have S-phase promoting (SPF) activity in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Sci.* 109: 1555–1563.

Suryadinata, R., Sadowski, M., ja Sarcevic, B. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci. Rep.* 30: 243–255.

Zhang, C., Elkahoul, A.G., Robertson, M., Gills, J.J., Tsurutani, J., Shih, J.H., Fukuoka, J., Hollander, M.C., Harris, C.C., Travis, W.D., *et al.* (2011). Loss of Cytoplasmic CDK1 Predicts Poor Survival in Human Lung Cancer and Confers Chemotherapeutic Resistance. *PLoS One* 6: e23849.

Zhao, M.Y., Auerbach, A., D'Costa, A.M., Rapoport, A.P., Burger, A.M., Sausville, E.A., Stass, S.A., Jiang, F., Sands, A.M., Aguilera, N., *et al.* (2009). Phospho-p70S6K/p85S6K and *cdc2/cdk1* are novel targets for diffuse large B-cell lymphoma combination therapy. *Clin. Cancer Res.* 15: 1708–1720.

Zhao, M., Kim, Y.T., Yoon, B.S., Kim, S.W., Kang, M.H., Kim, S.H., Kim, J.W., Park, Y.W. (2006). Expression profiling of cyclin B1 and D1 in cervical carcinoma. *Exp. Oncol.* 28: 44–48.

Zou, H., McGarry, T.J., Bernal, T., ja Kirschner, M.W. (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* 285: 418–422.

Takizawa, C.G., ja Morgan, D.O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 658–665.

Tang, W., Sun, Z.Y., Pannell, R., Gurewich, V., ja Liu, J.N. (1997). An efficient system for production of recombinant urokinase-type plasminogen activator. *Protein Expr. Purif.* 11: 279–283.

Taylor, W.R., Deprimo, S.E., Agarwal, A., Agarwal, M.L., Schö Nthal, A.H., Katula, K.S., ja Stark, G.R. (1999). Mechanisms of G2 Arrest in Response to Overexpression of p53. *Mol. Biol. Cell* 10: 3607–3622.

- Thomas, P., ja Smart, T.G. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 51: 187–200.
- Waugh, D.S. (2005). Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* 23: 316–320.
- Won, K. a, Schumacher, R.J., Farr, G.W., Horwich, a L., ja Reed, S.I. (1998). Maturation of human cyclin E requires the function of eukaryotic chaperonin CCT. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7584–7589.
- Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K.H., ja Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269: 1281–1284.
- Xiao, Z.X., Ginsberg, D., Ewen, M., ja Livingston, D.M. (1996). Regulation of the retinoblastoma protein-related protein p107 by G1 cyclin-associated kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 4633–4637.
- Yam, C.H., Fung, T.K., ja Poon, R.Y.C. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1317–1326.
- Yang, J., Bardes, E.S., Moore, J.D., Brennan, J., Powers, M.A., ja Kornbluth, S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev.* 12: 2131–2143.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Reelika Schilf

(sünnikuupäev: 17.03.2016)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose: Peamiste eukarüootset rakutsükliit reguleerivate tsükliin-CDK komplekside ekspresseerimine ja puhastamine imetaja rakkudest, mille juhendaja on Ervin Valk.
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **24.05.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016